

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
NÁDIA SABCHUK

RESPOSTA METABÓLICA DO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia coriiceps*
FRENTE AO ESTRESSE TÉRMICO

CURITIBA
2013

NÁDIA SABCHUK

RESPOSTA METABÓLICA DO PEIXE ANTÁRTICO *Notothenia coriiceps*
FRENTE AO ESTRESSE TÉRMICO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Lucélia Donatti

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Sabchuk, Nádia

Resposta metabólica do peixe antártico *Notothernia coriiceps* frente ao estresse térmico. / Nádia Sabchuk. – Curitiba, 2013.
76 p.: il.

Orientadora: Lucélia Donatti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

1. Regiões antárticas 2. Temperatura 3. Metabolismo energético 4. Peixe - Antártida I. Título II. Donatti, Lucélia III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

CDD (20. ed.) 597.58



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



**Ata da defesa de Dissertação de mestrado da
aluna Nádia Sabchuk.**

Aos vinte sete dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, foi realizada no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa da dissertação da mestrandia Nádia Sabchuk, intitulada: "Resposta metabólica do peixe antártico *Notothenia coriiceps* frente ao estresse térmico.". A abertura teve início às 14h00 min. pela doutora Lucélia Donatti, orientadora e presidente da banca. A senhora presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e em seguida passou a palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral a doutora Lucélia Donatti passou a palavra ao primeiro examinador, doutora Silvia Romão. Usou a palavra o segundo examinador, doutora Flavia Sant'Anna Rios. Finda a defesa da dissertação, a senhora presidente da banca examinadora, fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a banca iria proceder ao ato de atribuição do resultado final, reunindo-se em sessão secreta. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após este intervalo, foram proclamados os resultados atribuídos pela banca examinadora, que decidiu pela "aprovação da dissertação", tendo a candidata cumprido o artigo sessenta e cinco da Resolução (65/09) – CEPE, e a mesma fez juz ao grau de Mestre em Ecologia e Conservação, área de concentração Ecologia e Conservação. Como não havia nada mais a ser tratado, a doutora Lucélia Donatti, presidente da banca examinadora, após informar que a candidata tem, a partir desta data, sessenta dias para a entrega da versão definitiva de sua dissertação, deu por encerrada a sessão. Eu, Valéria Cristina Sallai Romeiro, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os membros examinadores.

Profª. Dra. Lucélia Donatti
Orientadora e Presidente

Lucélia Donatti

Profª. Dra. Silvia Romão
Membro

Silvia Romão

Profª. Dra. Flavia Sant'Anna Rios
Membro

Flavia Rios

Valéria Cristina Sallai Romeiro
Secretária

Valéria Sallai

Visto:

Profª. Dra. Maria Regina T. Boeger
Coordenadora do PPG-ECO

Maria Regina T. Boeger



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



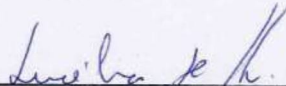
PARECER

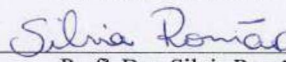
Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Nádia Sabchuk** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

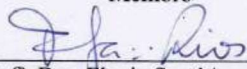
Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 27 de fevereiro de 2013.

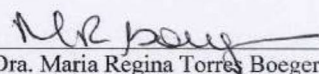
BANCA EXAMINADORA:


Prof.^a. Dra. Lucélia Donatti
Orientadora e Presidente


Prof.^a. Dra. Silvia Romão
Membro


Prof.^a. Dra. Flávia Sant'Anna Rios
Membro

Visto:


Prof.^a. Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO

Dedico

Ao 2º tenente Santos – o Santinho

Ao 2º tenente Carlos Alberto – o Bahia

Em honra de sua memória, a pesquisa antártica não pode parar.

À vó Gertrudes

À vó Almira

Pelo amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente à Prof^a Dra Lucélia Donatti, por ser uma das protagonistas do meu amadurecimento profissional, por acreditar no meu potencial mais que eu mesma, por me dar o subsídio necessário para tornar esse trabalho realidade e por me oferecer a oportunidade de conhecer o lugar mais incrível da Terra.

Às professoras Dra Flávia Rios e Dra Sílvia Romão, por aceitarem participar da banca deste trabalho e pelas valiosas contribuições.

À minha mãe, Helfi, que me ensinou a lutar pela vida. À ela que abriu mão de tudo para ser a melhor mãe do mundo, que é minha força, meu apoio e minha inspiração. Agradeço imensamente por ser quem estive ao meu lado com um amor incondicional.

Ao meu pai, Gerson, por sempre apoiar minhas decisões, e por me guiar no caminho do estudo. Por me ensinar que a vida é feita de escolhas e a aproveitar as oportunidades que a vida oferece.

Aos meus irmãos Cristiano, Michel e Luiza por me lembrarem que é a família que permanece ao nosso lado, não importa o que aconteça. Por estarem ao meu lado sendo pessoas incríveis.

À Bia, por ser e me aceitar como uma irmã e por me dar o presente mais precioso do mundo, minha sobrinha Maria Clara.

Aos meus cães, especialmente a Raimunda, por me trazerem amor e carinho nos momentos de tensão.

À Camille e à Pablilline, as melhores amigas de sempre, por tornar os momentos difíceis mais fáceis de viver, por entenderem as faltas, atrasos e a distância. Às amigas Roberta, Juliana, Marcelle e Mariane, pelas risadas, companhia, apoio e por aguentarem as reclamações.

À Priscila, indispensável para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade alegre e pela ajuda com estudos, discussões, pesquisas, artigos e cafés. Pelo apoio e consolo quando tudo parecia pesado demais para carregar sozinha.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Adaptativa, pela amizade e parceria nos momentos de festa, de café e de trabalho. A Pri, Cíntia e Maria Rosa pelo ombro amigo no momento difícil. À Cíntia pela ajuda na bioquímica e com os

equipamentos. À Tania pela pelos conselhos e pela ajuda com a estatística e na elaboração dos gráficos. À Banana pela realização de vários procedimentos deste trabalho. Ao Danilo, por me ensinar as técnicas de determinação de atividade enzimática e pelas dicas valiosas.

A Tania, Flavinha, Banana, Cíntia e Mari pela realização das coletas e análises nos invernos antárticos de 2009 e 2010.

Aos amigos Patrick, Fabio, Sandrinha, Gabriel, Victor e a todos que estiveram presentes na 2ª e 3ª fases da OPERANTAR XXX pelos momentos impagáveis vividos na EACF.

À Valéria Romero, secretária do PPGECO, pela amizade e pela resolução de todos os meus problemas.

Ao Grupo Base da OPERANTAR XXX, pela parceria e pelos momentos agradáveis vividos na EACF. Agradeço pela luta e pelo abraço de consolo.

Aos colegas e amigos do PPGECO pelo apoio, desabafos e parceria. Aos professores do PPGECO, pela contribuição imensurável à minha formação profissional e por me permitir a paixão pela Ecologia.

Ao Itiberê Bernardi, por me ensinar muito sobre o que é ser uma Bióloga.

Ao PPGECO – UFPR, ao MCT, ao INCT-APA, à CIRM, ao PROANTAR e à Marinha do Brasil, pelo apoio financeiro e logístico indispensáveis para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Programa REUNI, pela concessão da bolsa.

A todos que, de alguma forma, ajudaram ou não atrapalharam, muito obrigada

.

RESUMO

A região da Península Antártica tem exibido um aquecimento acelerado nos últimos 50 anos, tendo aquecido 1,5°C entre 1950 a 2006, contra 0,6°C do restante do planeta, o que tem levado bioquímicos e fisiologistas a questionar a adaptação e a plasticidade metabólica dos organismos antárticos frente a elevação de temperaturas ambientais. A Baía do Almirantado, local deste estudo, conta com grande disponibilidade de informações sobre a composição de solos e sedimentos, bem como sobre o degelo associado com a formação de microambientes e com variações na salinidade, sendo um ambiente adequado para os estudos sobre as adaptações evolutivas de organismos antárticos. Ectotérmicos antárticos são tidos como organismos altamente estenotérmicos, uma vez que a alta estabilidade da temperatura de seu habitat levaria a compensações metabólicas que inviabilizariam a manutenção das funções fisiológicas frente a um aquecimento ambiental. *Notothernia coriiceps* Richardson 1844 (Perciformes: Notothenioidei) é uma das quatro espécies de maior ocorrência na Baía do Almirantado, tendo importância ecológica na cadeia trófica da região, o que a torna adequada para estudos voltados às respostas metabólicas de organismos antárticos. Com o objetivo de avaliar aspectos do metabolismo energético e oxidativo de *N. coriiceps* frente ao estresse por aquecimento, foram realizados bioensaios por 1, 4, 15 e 30 dias nas temperaturas de 4°C e 8°C com o respectivo controle em 0°C, em situação de choque térmico. Ao final dos bioensaios, foram coletadas amostras de sangue e tecidos hepático e muscular. Foram dosados os constituintes plasmáticos e a hemoglobina, além das concentrações dos substratos energéticos nos tecidos hepático e muscular (proteínas e glicogênio). Foi mensurada também a atividade das enzimas hepáticas CS, G6Pase, LDH, MDH e SOD, bem como das enzimas musculares LDH, MDH e SOD. Foi observado que a temperatura de 8°C é mais estressante que 4°C, uma vez que *N. coriiceps* não sobrevive por mais do que 5 dias em 8°C. Embora haja respostas no sentido de compensar a demanda energética em 8°C, tais como o aumento da concentração de hemoglobina, hiperglicemia e mobilização de glicogênio hepático, estas não parecem suficientes para compensar os efeitos letais do choque térmico nesta temperatura. Em 4°C a resposta metabólica é lenta, sendo evidente em 30 dias, representada principalmente pelo aumento na concentração de hemoglobina e na atividade da LDH hepática, além de hiperglicemia e mobilização de glicogênio. Já a resposta do sistema de defesa antioxidante, representado pelo aumento na atividade da SOD muscular, ocorre em 4 dias. Em suma, a capacidade de ajuste de *N. coriiceps* frente ao estresse por aquecimento é diferenciada em 4°C e 8°C, sendo que em 8°C esta espécie sobrevive pouco tempo.

Palavras-chave: Antártica. Temperatura. Metabolismo energético. Choque térmico. *Notothernia coriiceps*.

ABSTRACT

The Antarctic Peninsula region has exhibited an accelerated warming over the past 50 years, having warmed 1.5°C from 1950 to 2006, compared with 0.6°C from the rest of the planet, leading biochemists and physiologists to ask questions about the adaptation and the metabolic plasticity of Antarctic organisms in face of rising environmental temperatures. The Admiralty Bay, the site of this study, has a great availability of information on the composition of soils and sediments, as well as on the snowbreak associated with the formation of microenvironments and variations in salinity, being an appropriate environment for studies on evolutionary adaptations of Antarctic organisms. Antarctic ectotherms are considered to be highly stenothermic organisms, since the high temperature stability of their habitat would lead to metabolic compensations that would prevent the maintenance of physiological functions in face of environmental warming. *Notothernia coriiceps* Richardson 1844 (Perciformes: Notothenioidei) is one of the four most common species in Admiralty Bay, having ecological importance in the trophic chain of the region, making it suitable for studies focused on the metabolic responses of Antarctic organisms. In order to evaluate aspects of the energy and oxidative metabolism of *N. coriiceps* under heat stress, bioassays were performed for 1, 4, 15 and 30 days at temperatures of 4°C and 8°C with the respective control at 0°C in thermal shock. At the end of the bioassays, blood, and liver and muscle tissue samples were collected. Plasma constituents and hemoglobin were measured, as well as concentrations of energetic substrates in liver and muscle tissues (proteins and glycogen). The activity of liver enzymes CS, G6Pase, LDH, MDH and SOD, as well as muscle enzymes LDH, MDH and SOD were also measured. It was noticed that the temperature of 8°C is more stressful than 4°C, since *N. coriiceps* does not survive for more than 5 days at 8°C. Although there are responses to compensate for energy demand at 8°C, such as increased hemoglobin concentration, hyperglycemia, and hepatic glycogen mobilization, these do not seem sufficient to compensate for the lethal effects of heat shock at this temperature. At 4°C the metabolic response is slow, being evident at 30 days, represented mainly by the increase in hemoglobin concentration and hepatic LDH activity, in addition to hyperglycemia and glycogen mobilization. The response of the antioxidant defense system, represented by the increase in muscle SOD activity, occurs in 4 days. In short, *N. coriiceps* ability to adjust to heat stress is differentiated at 4°C and 8°C, and at 8°C this species survives shortly.

Key words: Antarctic. Temperature. Energy metabolism. Heat shock. *Notothernia coriiceps*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MAPA DA LOCALIZAÇÃO DA EACF, COM OS PONTOS DE COLETA DOS PEIXES INDICADOS POR PP (PUNTA PLAZA) E AR (EM FRENTE À ESTAÇÃO POLONESA DE ARCTOWSKI).....	25
5	
FIGURA 2 – EXEMPLARES DE <i>Notothenia coriiceps</i>	266
FIGURA 3 – COLETA DOS EXEMPLARES DE <i>Notothenia coriiceps</i> A BORDO DE BOTES PNEUMÁTICOS OU A BORDO DA LANCHA OCEANOGRÁFICA "SKUA".....	277
FIGURA 4 – MÓDULO DE AQUÁRIOS DA EACF, ANIMAIS EM CONDIÇÃO EXPERIMENTAL, E PROCEDIMENTO DE SACRIFÍCIO E COLETA DOS TECIDOS DE <i>Notothenia coriiceps</i>	299
FIGURA 5 – VARIAÇÃO DOS METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE EM 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.....	377
FIGURA 6 – VARIAÇÃO DOS ELETRÓLITOS PLASMÁTICOS NÃO PROTEICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE EM 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.....	388
FIGURA 7 – VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS (A E B) E DE GLICOGÊNIO (C E D) DOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE EM 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.....	39
FIGURA 8 – VARIAÇÃO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM FÍGADO E MÚSCULO DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.....	42
FIGURA 9 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO	

ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.....	44
FIGURA 10. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ELETRÓLITOS PLASMÁTICOS NÃO PROTEICOS DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.....	45
FIGURA 11. VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS (A E B) E DE GLICOGÊNIO (C E D) DOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.....	477
FIGURA 12. VARIAÇÃO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM FÍGADO E MÚSCULO DE <i>Notothenia coriiceps</i> SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES REALIZADAS NESTE TRABALHO.....	30
TABELA 2 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES PLASMÁTICOS DE <i>NOTOTHENIA CORIICEPS</i> ...	31
TABELA 3 – TABELA DE ANOVA RESUMIDA CONTENDO O VALOR DE F E O RESPECTIVO VALOR DE P PARA AS ANÁLISES DE EXPOSIÇÃO A 0°C E 4°C POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.....	75
TABELA 4 – TABELA DE ANOVA RESUMIDA CONTENDO O VALOR DE F E O RESPECTIVO VALOR DE P PARA AS ANÁLISES DE EXPOSIÇÃO A 0°C, 4°C E 8°C POR 1 E 4 DIAS.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	ESPÉCIE ESTUDADA	25
3.2	COLETA E ACLIMATAÇÃO	27
3.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
3.4	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	29
3.4.1	Constituintes plasmáticos.....	29
3.4.2	Concentração dos substratos energéticos teciduais	31
3.4.3	Atividade Enzimática	31
3.4.4	Tratamento Estatístico.....	33
4	RESULTADOS	35
4.1	EXPOSIÇÃO A 0°C E 4°C POR 1, 4, 15 E 30 DIAS	35
4.1.1	Constituintes Plasmáticos	35
4.1.2	Concentração Dos Substratos Energéticos Teciduais.....	39
4.1.3	Atividade Enzimática	40
4.2	EXPOSIÇÃO A 0°C, 4°C E 8°C POR 1 E 4 DIAS.....	43
4.2.1	Constituintes Plasmáticos	43
4.2.2	Concentração Dos Substratos Energéticos Teciduais.....	46
4.2.3	Atividade Enzimática	48
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	74
	ANEXO 1 Protocolo para determinação da concentração de glicogênio nos tecidos muscular e hepático. (DUBOIS et al, 1956, modificado por BIDINOTO et al, 1997).....	74
	ANEXO 2. Resultados da ANOVA resumidos, contendo o valor de F e o valor de p correspondente para as análises realizadas neste trabalho.....	75

1 INTRODUÇÃO

A Antártica é considerada um laboratório natural para estudos de evolução, radiação adaptativa e sistema climático global, dadas as peculiaridades de seu histórico de formação e sua configuração e características atuais (CLARKE et al., 2007; MASSOM; STAMMERJOHN, 2010).

Entre 83 e 65 milhões de anos atrás, o supercontinente Gondwana iniciou o processo de fragmentação; a plataforma continental antártica ainda estava ligada à Austrália e à América do Sul (PECK et al., 2006). Neste período, havia grande disponibilidade de habitats de águas rasas na plataforma continental antártica, o clima era temperado e a temperatura da água girava em torno de 12 – 14°C (CLARKE; JOHNSTON, 1996). Após períodos intermitentes de aquecimento, com a separação da Austrália da Antártica e sua migração para o norte, apareceram as primeiras evidências de resfriamento polar, com presença de gelo marinho e glaciação continental, entre o final do Eoceno e início do Oligoceno (43 – 35 milhões de anos). As temperaturas continuaram caindo até o limite Oligoceno – Mioceno (35 – 22 milhões de anos), quando se concluiu a separação da América do Sul da Península Antártica e foi aberta a Passagem de Drake (TRIPATI et al., 2005; ROGERS, 2007; SIEGERT; FLORINDO, 2008). Neste período, foi estabelecida também a Corrente Circumpolar Antártica (CCA), uma das maiores e mais velozes correntes oceânicas do planeta, expondo o continente antártico a um extenso isolamento oceanográfico e geográfico (CLARKE; JOHNSTON, 1996).

A temperatura nas latitudes mais altas permaneceu em declínio, com pequenos episódios de aquecimento no Mioceno Médio e no limite Plioceno/Pleistoceno. Acredita-se que alguns eventos mais recentes de aquecimento na Antártica possam ter disponibilizado habitats de águas rasas, permitindo eventos de radiação adaptativa das espécies marinhas ali abrigadas (CLARKE; JOHNSTON, 1996).

Atualmente, a temperatura média da água no Oceano Austral é -1,87°C, o que caracteriza o isolamento térmico imposto à fauna da região. Além disso, a plataforma continental antártica apresenta uma alta estabilidade térmica e salina, bem como uma sazonalidade muito marcada, associada ao regime de luz característico de regiões polares. Na zona de transição da convergência antártica, onde a estabilidade térmica é menos evidente, a temperatura pode variar em até 2°C

em relação às latitudes mais baixas, o que impede o intercâmbio de espécies entre o Oceano Austral e as latitudes mais ao norte, contribuindo para o isolamento das espécies abrigadas no ambiente antártico (EASTMAN, 1993; BARNES; PECK, 2008).

Cerca de 322 espécies de peixes demersais e pelágicos já foram registradas na Antártica, desde a primeira coleta na expedição de J.C. Ross, de 1839 a 1843. Representando cerca de 1,5% da ictiofauna mundial, a ictiofauna antártica se caracteriza por baixa densidade e diversidade de espécies, com um endemismo que chega a 88%, cerca de três vezes maior que o observado em outras faunas marinhas isoladas (EASTMAN, 2005; ESCHMEYER et al., 2010).

Embora haja espécies ocupando os diversos nichos na coluna d'água, cerca de 70% da ictiofauna antártica é predominantemente bentônica (EASTMAN, 2005). A superordem Notothenioidei (Perciformes) é a mais expressiva, representando 101 das 222 espécies bentônicas, distribuídas em 6 famílias. A família Nototheniidae é dominante em abundância e biomassa, representando cerca de 45% da abundância de peixes da região (EASTMAN, 2005). Este grupo de peixes se adaptou muito bem às mudanças ambientais impostas pela migração do continente ao pólo sul, ocupando diversos nichos na coluna d'água e apresentando características fisiológicas e bioquímicas que os destacam dos peixes dos demais ecossistemas mundiais (CLARKE; JOHNSTON, 1996; EASTMAN, 2005).

A baixa diversidade taxonômica da ictiofauna antártica e seu elevado endemismo podem ser atribuídos às características do ambiente relacionadas à sua posição geográfica (KOCK, 1992; ESCHMEYER et al., 2010). As baixas temperaturas, e a consequente solubilidade elevada de oxigênio na água, a alta estabilidade térmica do meio, a redução na disponibilidade de habitat, a sazonalidade na produção primária e disponibilidade de recursos, a presença de gelo no mar, o fotoperíodo e a pressão das sucessivas glaciações, além do isolamento oceanográfico e geográfico, são apontados como fatores que moldaram a atual diversidade de peixes na Antártica (EASTMAN, 1993; CLARKE; JOHNSTON, 1996).

Estas características do continente antártico levaram os animais a experimentar adaptações de diversos tipos para sobreviver a estas condições. Os sistemas enzimáticos, por exemplo, preservaram as estruturas proteicas com propriedades cinéticas e físico-químicas vantajosas para a catálise de reações a

baixas temperaturas, um fenômeno conhecido como “*cold adaptation*”, ou adaptação metabólica ao frio (KAWALL; SOMERO, 1996; KAWALL, 1998; SOMERO et al. 1998; SOMERO, 2004). O conceito de “*cold adaptation*” é bem estabelecido na literatura, e define que peixes polares teriam taxa metabólica basal maior que o esperado para peixes de ambientes tropicais ou temperados na mesma temperatura corporal (WOHLSHLAG, 1960).

Algumas características fisiológicas tem importância fundamental na adaptação metabólica ao frio. O conteúdo enzimático das mitocôndrias dos organismos antárticos é aumentado, possibilitando a produção de ATP adequada às necessidades energéticas do organismo (LONDRAVILLE; SIDELL, 1990; O'BRIEN; SIDELL, 2000). A presença de glicoproteínas anticongelantes (AFGP, do inglês *Antifreezing Glicoproteins*), responsáveis por diminuir o ponto de congelamento dos fluidos corporais, é outra novidade evolutiva chave nos peixes antárticos (CLARKE; JOHNSTON, 1996). Mecanismos visando a diminuição da viscosidade do sangue, como a redução do número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina, também são fundamentais para a sobrevivência destas espécies, pois garantem uma distribuição adequada de oxigênio nos tecidos (KNOX, 1994; DI PRISCO et al., 2007). Vale ressaltar que a solubilidade do oxigênio aumenta à medida que a temperatura cai, sendo que a diminuição, ou mesmo a perda total dos pigmentos respiratórios, como é o caso do *icefish* (*Chaenocephalus aceratus*), é compensada pela eficiência na distribuição de oxigênio em baixas temperaturas, acompanhada de outros mecanismos, tais como aumento no débito cardíaco e na densidade capilar e maior número de mitocôndrias (FITCH et al., 1984; SIDELL, 1998; O'BRIEN; SIDELL, 2000; EASTAMN; LANNON, 2004; SIDELL; O'BRIEN, 2006). O aumento na fluidez das membranas biológicas, associado à concentração aumentada de ácidos graxos insaturados também é apontado como um mecanismo que garante a estabilidade dos processos bioquímicos nos organismos antárticos (GIESEG et al., 2000).

A faixa de temperatura crítica para sobrevivência de organismos antárticos é bem inferior àquela de organismos provenientes de regiões tropicais ou temperadas (BILYK; DEVRIES, 2011). Isto está relacionado à estabilidade térmica do meio, que leva os organismos antárticos a regular seu metabolismo de forma que os processos bioquímicos sejam otimizados na estreita faixa de temperatura de seu ambiente, processo conhecido por estenotermia (LEVINS, 1968; HOCHACHKA; SOMERO,

1968; HOCHACHKA; LEWIS, 1971; FIELDS; SOMERO, 1998). Acredita-se que, devido à estenotermia, as espécies marinhas antárticas teriam capacidade reduzida de tolerância ao aumento da temperatura ambiental, provavelmente como uma compensação pela adaptação às condições constantemente frias (BRETT, 1970; CLARKE et al., 2007). A pressão de seleção exercida pelas baixas temperaturas pode, então, ter imposto limites físico-químicos ao desempenho das estruturas proteicas de organismos antárticos quando submetidos a temperaturas mais elevadas, de forma que poderia ser inviabilizada a manutenção das necessidades metabólicas diante de um possível aquecimento na região (HOFMANN et al., 2000; BARBOSA et al., 2005). Contudo, estudos tem demonstrado certa capacidade de aclimação em organismos antárticos submetidos temperaturas superiores à ambiental, por meio de compensações metabólicas variadas sob aumento crônico de temperatura (SEEBACHER et al., 2005; LOWE et al., 2005; LANNIG et al., 2005; ROBINSON; DAVISON, 2007; HEISE; ABELE, 2008; HUDSON et al., 2008; BILYK; DEVRIES, 2011).

O entendimento da complexidade do metabolismo energético e dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos em seu funcionamento, portanto, é de suma importância, considerando a essencialidade dos processos geradores de ATP na manutenção de processos vitais. A necessidade energética dos peixes, de modo geral, varia em função do seu tamanho e da temperatura da água, sendo influenciada também por outros fatores, como o tipo de dieta, atividades fisiológicas como reprodução, movimentação e excreção, e fatores ambientais (GUILLAUME et al., 2001, MARK et al. 2002).

Elemento marca-passo¹ do metabolismo anaeróbico, a enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a conversão do piruvato a L-lactato, com a concomitante conversão de NADH em NAD⁺, sendo a enzima terminal da glicólise anaeróbia (TORRES; SOMERO, 1988; CARVALHO et al., 1998; NELSON; COX, 2008). O lactato produzido em tecidos como a musculatura branca, sistema nervoso e rins é transportado para a corrente sanguínea, sendo captado pelos hepatócitos, onde a LDH tende a realizar a reação inversa, disponibilizando piruvato para a gliconeogênese ou para o ciclo do ácido cítrico (CARVALHO et al., 1998; NELSON;

¹ Uma enzima marca-passo é aquela cuja atividade determina o sentido e a velocidade de fluxo numa determinada via metabólica de modo que, avaliando sua atividade, é possível interpretar aspectos relativos à via metabólica de interesse (BERG et al., 2004).

COX, 2008). A enzima terminal da gliconeogênese, a glicose-6-fosfatase (G6Pase), presente no fígado e, em menor quantidade, nos rins, catalisa a hidrólise da glicose-6-fosfato proveniente tanto da via gliconeolítica quanto da glicogenólise, produzindo glicose livre, a qual é exportada para o sangue, atuando na manutenção da glicemia no estado de jejum. Esta é uma enzima transmembrana localizada no retículo endoplasmático, dependente de íons Mg^{2+} com papel importante na regulação da glicemia, junto à enzima hexoquinase, que catalisa a reação inversa (NELSON; COX, 2008).

De acordo com Hochachka e Somero (1968), a principal característica selecionada na adaptação evolutiva das enzimas à temperatura é a afinidade ao substrato. Isso significa que animais ectotérmicos devem exibir sua máxima afinidade com o substrato na temperatura que coincide com a faixa de temperatura de seu habitat – que no caso dos organismos antárticos é bastante estreita. As diferenças nas propriedades cinéticas e estabilidade térmica dos ortólogos da LDH em organismos antárticos são devidas a substituições sutis de aminoácidos fora do sítio ativo da enzima, alterando suas propriedades conformacionais de modo a favorecer a reação na faixa de temperatura que o organismo vive (HOLLAND et al., 1997; JOHNS; SOMERO, 2004; PETRICORENA; SOMERO, 2007).

Tecidos essencialmente aeróbicos, como cérebro ou fígado, apresentam isoformas da LDH com limitada capacidade de conversão do piruvato em lactato, favorecendo a canalização do piruvato ao ciclo do ácido cítrico. A musculatura branca, no entanto, devido a sua tolerância a elevadas concentrações de piruvato, pode apresentar isoformas da LDH que, sendo menos sensíveis à inibição pelo piruvato, favorecem a glicólise anaeróbia, em especial sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio associada com o aumento da temperatura (SOMERO, 1973). Isso porque as propriedades cinéticas da LDH podem mudar de acordo com a temperatura ambiental, resultando em diferentes destinos metabólicos para o piruvato. Em temperaturas elevadas, o piruvato pode ser canalizado para o metabolismo anaeróbio, dada a menor disponibilidade de oxigênio, de forma que a LDH apresenta menor afinidade e, conseqüentemente, menor inibição pela concentração de piruvato, resultando em maiores níveis de produção de lactato, favorecendo, então, a glicólise anaeróbia (HOCHACHKA; SOMERO, 1968; HOCHACHKA; LEWIS, 1971; SOMERO, 1973; FITCH, 1988; RODRIGUES et al., 1995; FIELDS; SOMERO, 1998). Por outro lado, em temperaturas mais baixas, o

piruvato será preferencialmente canalizado para o ciclo do ácido cítrico, de forma que a reação da LDH em direção à formação de lactato tem papel reduzido (HOCHACHKA; LEWIS, 1971; SOMERO, 1973).

Envolvidas no metabolismo aeróbio, as enzimas citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH) fazem parte do ciclo do ácido cítrico, sendo importantes marcadores do potencial aeróbico gerador de ATP (RODRIGUES et al, 2012). A CS é responsável pela condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato proveniente de diversas fontes, reação inicial do ciclo do ácido cítrico, resultando na produção de citrato (NELSON; COX, 2008). Considera-se a CS, portanto, marca-passo do metabolismo aeróbio. Esta enzima é inibida pelo seu produto, o citrato, por altas razões $[NADH]/[NAD^+]$ e pelo succinil-CoA, cujas concentrações sinalizam abundância de intermediários do ciclo do ácido cítrico. A MDH, por sua vez, é a enzima final deste ciclo, catalisando a conversão do L-malato em oxaloacetato - que pode retornar ao ciclo - e regenerando uma molécula de NADH (NELSON; COX, 2008). A MDH está presente tanto no citoplasma como na matriz mitocondrial, e é capaz de realizar a reação inversa. Desta forma, participa do transporte de oxaloacetato da matriz mitocondrial para o citoplasma ao convertê-lo em malato, que pode atravessar a membrana mitocondrial, sendo novamente oxidado pela MDH citoplasmática, disponibilizando substrato para a gliconeogênese (NELSON; COX, 2008). Assim, a MDH é uma enzima fundamental na conexão entre o ciclo do ácido cítrico e a gliconeogênese.

A atividade e a expressão de proteínas e enzimas envolvidas no estresse oxidativo têm sido consideradas importantes biomarcadores para a avaliação de ectotérmicos antárticos, principalmente invertebrados, submetidos a estresse térmico (PARK et al., 2008a, PARK et al., 2008b). Peixes antárticos exibem uma preferência na utilização de ácidos graxos monoinsaturados como fonte energética (CROCKETT; SIDELL, 1990; SIDELL et al., 1995; BRODTE et al., 2008), o que leva a um aumento expressivo no potencial oxidativo da célula, relacionado à maior propensão à produção de peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio (ROS, da sigla em inglês *reative oxygen species*) (CROCKETT, 2011). Além disso, a maior disponibilidade de oxigênio, associada à sua alta solubilidade nos fluidos corporais em baixas temperaturas, poderia levar a uma produção acentuada de ROS (ANSALDO et al., 2000). Desta forma, um eficiente sistema de defesa antioxidante é fundamental para o equilíbrio redox destes organismos, uma

vez que ROS podem causar danos ao DNA e às membranas biológicas. Neste sentido, a enzima superóxido dismutase (SOD) tem um papel importante, pois catalisa a redução do radical superóxido a peróxido de hidrogênio, que pode ser finalmente processado pela catalase, produzindo água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). Abele e Puntarulo (2004) apontam níveis teciduais de SOD em condições ambientais normais mais elevados em ectotérmicos antárticos que em animais tropicais ou de ambientes temperados.

Alterações metabólicas de diversos tipos são exibidas por peixes antárticos submetidos a estresse por aquecimento. Por exemplo, a concentração das AFGP é diminuída (JIN; DEVRIES, 2006), enquanto a concentração geral de proteínas teciduais, inclusive as proteínas de choque térmico de 70kDa (HSP70, da sigla em inglês *Heat Shock Proteins 70kDa*) pode aumentar (CARPENTER; HOFMANN, 2000; BRODTE et al., 2006). Ativação da resposta inflamatória clássica e aumento nas necessidades energéticas (THORNE et al., 2010), bem como uma diminuição no conteúdo de lipídeos, ácidos graxos e carboidratos teciduais também são apontados como respostas ao estresse térmico em vertebrados (KAMLER et al., 2001; BRODTE et al., 2006; 2008). Ainda é observada hiperglicemia associada à liberação de cortisol, além de alterações na osmolaridade plasmática, associadas ao estresse térmico (LOWE; DAVISON, 2005). O nível de lactato sanguíneo aumenta nos primeiros dias de aclimação ao calor, mas é compensado em alguns dias de bioensaio pela melhora na capacidade de transporte de oxigênio no sangue através de aumento do hematócrito e conteúdo de hemoglobina (HEISE; ABELE, 2008). De modo geral, considera-se que a fase inicial da aclimação a temperaturas elevadas causa hipoxemia nos órgãos centrais quando o aumento na taxa metabólica devido à elevação da temperatura excede a capacidade de transporte de oxigênio (PÖRTNER, 2002; HEISE; ABELE, 2008).

As mudanças na atividade enzimática em resposta à prolongada exposição a temperaturas diferentes da faixa ambiental do animal podem ser resultado de alterações na concentração da enzima ou na expressão de diferentes isoformas com diferentes propriedades cinéticas (HOCHACHKA; SOMERO, 2002). O limite de tolerância térmica dos organismos tem relação com a perda do balanço entre a demanda e o suprimento de oxigênio nos tecidos diante de estresse térmico (MARK et al., 2002), de modo que a modulação da atividade de enzimas do metabolismo energético é fundamental para garantir o suprimento de energia nos tecidos.

Seebacher et al. (2005) sugerem que exista uma regulação positiva (*upregulation*) dos processos de produção de energia em vez de uma regulação negativa (*downregulation*) dos processos que consomem energia, presumivelmente para o organismo se adequar aos altos custos de manutenção resultantes do aumento da temperatura. Em outras palavras, a tendência é que o organismo procure produzir mais energia em vez de reduzir o consumo energético.

A Península Antártica tem apresentado aquecimento acelerado no último século, com um aumento de cerca de 1,5°C entre 1950 e 2006, ao passo que o restante do planeta aqueceu em cerca de 0,6°C (EASTMAN, 1993; VAUGHAN et al., 2003; CLARKE et al. 2007). Como consequência, observa-se o colapso de plataformas de gelo, retração de glaciares e exposição de habitats terrestres, que normalmente ficavam cobertos de gelo permanentemente. O degelo intenso de geleiras, de neve acumulada durante o inverno e do gelo marinho leva a diminuição da salinidade e densidade do mar em regiões costeiras. Essas variações podem levar a alterações na cadeia alimentar, no metabolismo dos animais e em sua capacidade de ajuste e sobrevivência (FANTA et al., 1995; FANTA; KIDAWA, 1999; DI PRISCO, 2000, ROMÃO et al., 2001). A proximidade da Península Antártica, em especial as ilhas subantárticas, com a zona de transição da convergência antártica torna a fauna abrigada nestas ilhas, em especial a fauna marinha, vulnerável a eventuais alterações ambientais decorrentes do aquecimento da região (CLARKE et al., 2007).

A Ilha Rei George é a maior do arquipélago das Shetlands do Sul (Rakusa-Suszczewski, 1995), e é onde se localiza a Baía do Almirantado, que abriga a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). A temperatura média anual da água varia de -1,7°C a 2,0°C na superfície e de -1,1°C a 0,28°C em 400 m de profundidade, na coluna d'água a temperatura é de cerca de 0,4°C (KULENZ, 1994). A Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA#1) da Baía do Almirantado, com 363 km² (BRAUN et al., 2001; ARIGONY-NETO, et al., 2004), possui ampla disponibilidade de informações sobre a composição de solos e sedimentos, bem como sobre o degelo associado com a formação de microambientes (SCHAEFER et al., 2004) e com amplas variações na salinidade (FANTA et al., 1989; ROMÃO et al., 2001), tornando-a um ambiente adequado para estudos das relações tróficas (FANTA, 1999; FANTA et al., 1994; 2003a; 2003B; RIOS; FANTA, 1998; FANTA; MEYER, 1998) e adaptações evolutivas de organismos antárticos.

Diante das aceleradas alterações ambientais que a Península Antártica vem exibindo (EASTMAN, 1993; VAUGHAN ET AL., 2003; CLARKE ET AL. 2007), torna-se de fundamental importância a investigação acerca da plasticidade metabólica dos organismos deste ecossistema, a fim de se compreender os limites de tolerância e sobrevivência, bem como subsidiar estratégias de conservação das espécies. O metabolismo energético é um indicador importante dos níveis de estresse térmico, uma vez que a taxa metabólica é especialmente afetada diante de mudanças de temperatura. Do mesmo modo, a atividade do sistema antioxidante é diretamente impactada pelo aumento de temperatura, devido ao aumento da taxa metabólica e à diminuição na disponibilidade de oxigênio para os organismos aquáticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do aumento da temperatura (4°C e 8°C) sobre aspectos do metabolismo energético e do estresse oxidativo do peixe antártico *Notothenia coriiceps*, investigando possíveis variações nos constituintes plasmáticos e teciduais e na atividade de enzimas envolvidas na produção de energia e no sistema de defesa antioxidante da célula.

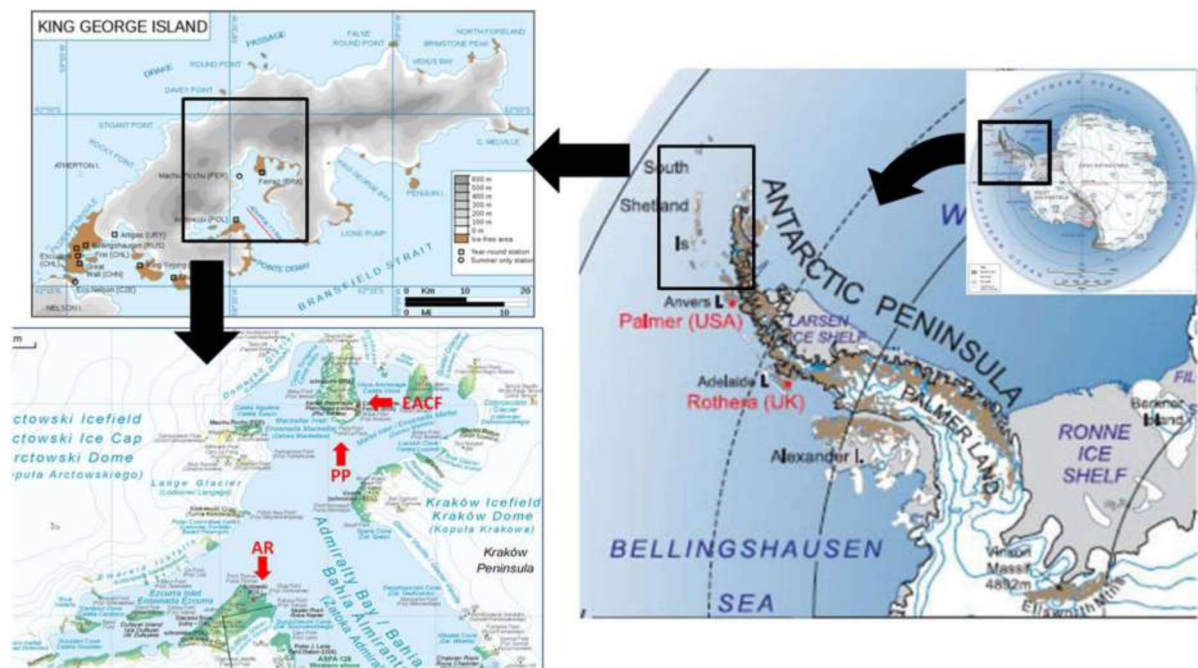
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar possíveis alterações no metabolismo energético, determinando os níveis plasmáticos de proteínas, metabólitos e eletrólitos não proteicos, bem como a concentração dos substratos energéticos teciduais (proteínas e glicogênio) no fígado e no músculo de *N. coriiceps* submetidos a estresse térmico.
- 2- Investigar o papel dos metabolismos aeróbio e anaeróbio em condição de estresse térmico, por meio da determinação da atividade de enzimas hepáticas e musculares envolvidas nestas vias metabólicas, bem como na gliconeogênese.
- 3- Avaliar a resposta ao estresse oxidativo ocasionado pelo aumento de temperatura, quantificando a atividade da enzima do sistema antioxidante superóxido dismutase hepática e muscular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), localizada na Baía do Almirantado (61°S e 63°30’S e 53°55’W e 62°50’W), Ilha Rei George, no Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica (Fig. 1). As licenças ambientais foram concedidas pelo Grupo de Assessoramento Ambiental do Ministério do Meio Ambiente do Brasil e o Código de Conduta do *Scientific Committee on Antarctic Research* (SCAR) foi adotado na manipulação e sacrifício dos animais. Esta pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o n° 496.

FIGURA 1 – MAPA DA LOCALIZAÇÃO DA EACF, COM OS PONTOS DE COLETA DOS PEIXES INDICADOS POR PP (PUNTA PLAZA) E AR (EM FRENTE À ESTAÇÃO POLONESA DE ARCTOWSKI).



FONTE: modificado de Simões et al. (2004).

3.1 ESPÉCIE ESTUDADA

Notothenia coriiceps Richardson, 1844 (Fig. 2) pertence a ordem Perciformes, subordem Notothenioidei, família Nototheniidae, sendo comumente denominados *cod icefishes*, ou seja, “bacalhaus do gelo”. É uma espécie com distribuição circumpolar, muito abundante nos mares da Antártica (BELLISIO;

TOMO, 1973). São peixes de tamanho médio, com corpo fusiforme, com comprimento total médio de 388cm e peso médio de 825g, para os machos, e 950g para as fêmeas (BELLISIO, 1964). Sua coloração é cinza escuro, com manchas alaranjadas, verdes, vermelhas e azuladas pelo corpo, conferindo certo mimetismo em relação ao ambiente (BELLISIO, 1964).

As águas costeiras antárticas são relativamente profundas, uma vez que a plataforma continental desta região é caracteristicamente muito curta (KNOX, 1994). *N. coriiceps* habita os locais mais costeiros, em profundidades de 0 a 450m, sendo frequentemente encontrada a 200m de profundidade. Trata-se de uma espécie sedentária, sendo frequentemente observada entre algas ou em abrigos, apresentando limitadas natação e movimentação, e se alimentando de presas errantes, pela estratégia de predação de emboscada (DONATTI, 2000). Os peixes antárticos, de modo geral, apresentam crescimento lento e sazonal e alta longevidade, não atingindo grandes tamanhos (KNOX, 1994). A dieta de *N. coriiceps* consiste de organismos bentônicos, como anfípodas e animais constituintes do zooplâncton, bem como de macroalgas (BELLISIO, 1964), e pode exibir algumas variações de acordo com a profundidade na qual o animal vive (KNOX, 1994).

FIGURA 2. EXEMPLARES ADULTOS DE *Nototothenia coriiceps*..

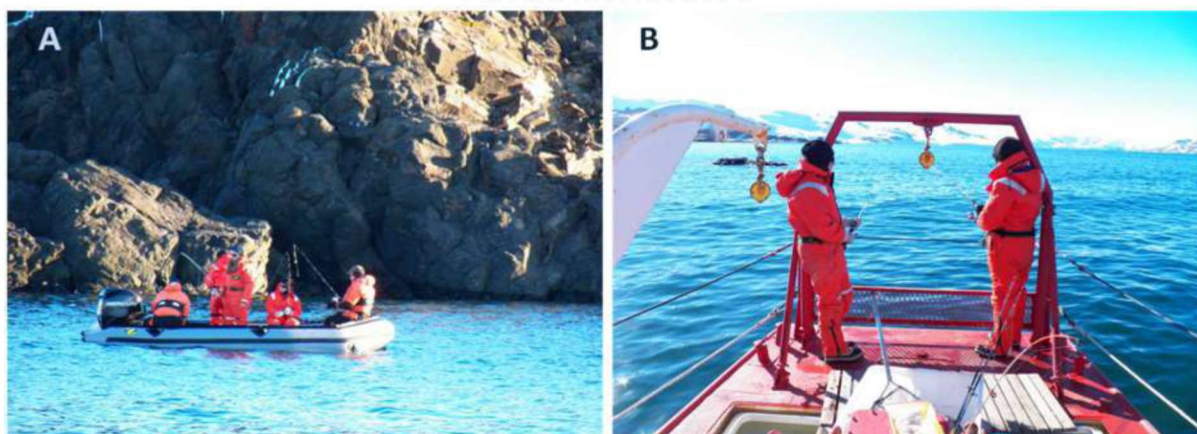


FONTE: (A) Luciana Badeluk Cetina (2009) (B) a autora (2012).

3.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO

Exemplares de *Notothenia coriiceps*, pesando entre 500 e 700g, foram capturados com linha e anzol no litoral da Baía do Almirantado, nas localidades de Punta Plaza (PP) (62°05' 64,5" S; 58° 24' 31.7" W) e Arctowski (AR) (62°10', 65" S; 58° 26',5 W) (Fig. 1), no período de março a novembro de 2009 e 2010. A profundidade de coleta variou de 10 a 25 m, e foi realizada a bordo de botes pneumáticos "Zodiac" ou a bordo da lancha de apoio oceanográfico "Skua" (Fig. 3). No bote pneumático, os animais foram mantidos em caixa de "marfinite" até sua chegada à EACF, sendo renovada 50% da água a cada hora para aeração. Na lancha "Skua", os peixes foram mantidos em aquários com renovação de água até sua chegada à EACF. Os peixes foram, então, transportados para os módulos de aquários da EACF (Fig. 4A) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), salinidade ($35 \pm 1,0$ psu), fotoperíodo (12 horas luz e 12 horas escuro) e aeração durante 5 dias.

FIGURA 3 – COLETA DOS EXEMPLARES DE *Notothenia coriiceps* (A) A BORDO DE BOTES PNEUMÁTICOS OU (B) A BORDO DA LANCHA OCEANOGRÁFICA "SKUA". FOTOS DA AUTORA.



FONTE: a autora (2012).

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os bioensaios foram conduzidos em salas climatizadas que abrigam tanques com capacidade de 1000 L nas dependências da EACF (Fig. 4A). A água do mar foi bombeada de uma profundidade de 4 m em frente a EACF para os tanques. Os tanques foram limpos e 50% da água foi trocada a cada dois dias. Os níveis de

amônia, nitrito e o pH foram mensurados como indicadores da qualidade da água. Todos os ensaios foram realizados com no máximo 5 peixes por tanque (Fig. 4B), com um total de 10 peixes por situação experimental, sendo que cada situação experimental é caracterizada por uma temperatura e tempo de exposição específicos. Os animais foram alimentados com músculo epaxial de peixes antárticos, oferecido a cada dois dias na quantidade correspondente a 1% de sua massa corpórea.

Após a aclimação, os peixes foram submetidos a temperaturas de 0°C, 4°C e 8°C, sendo mantidas as demais condições abióticas do período de aclimação, pelos períodos de 1, 4, 15 e 30 dias (Tab. 1). A temperatura da água foi controlada rigorosamente por termostatos Aquaterm 09-01T-11457 (Full Cauge) e os peixes foram colocados diretamente na temperatura desejada não havendo uma aclimação progressiva, mas sim um choque térmico. Ao término dos bioensaios, os animais foram anestesiados com benzocaína 1% ($p\ v^{-1}$) e eutanaziados por secção medular (Figs. 4C e 4D). Amostras de sangue, fígado e músculo branco epaxial foram coletadas e congeladas em freezer -33°C, visando diferentes procedimentos analíticos.

O material biológico oriundo dos experimentos foi mantido em freezer -33°C na EACF e transportado também em freezer -33°C ao Brasil pelo Navio de Apoio Oceanográfico (NAPoc) Ary Rongel. O material destinado aos procedimentos analíticos foi encaminhado sob refrigeração ao Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – UFPR.

FIGURA 4 – (A) MÓDULO DE AQUÁRIOS DA EACF, (B) ANIMAIS EM CONDIÇÃO EXPERIMENTAL, E (C E D) PROCEDIMENTO DE SACRIFÍCIO E COLETA DOS TECIDOS DE *Notothenia coriiceps*.



FONTE: Luciana Badeluk Cettina (2009).

3.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Na Tabela 1, estão resumidas as análises feitas neste trabalho e o número amostral correspondente a cada análise.

3.4.1 Constituintes plasmáticos

A coleta de sangue dos animais foi realizada por punção da veia caudal com seringa heparinizada. O sangue total foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos para extração do plasma, o qual foi congelado e transportado ao Laboratório de Biologia Adaptativa da UFPR, onde foram determinados os constituintes plasmáticos (glicose, colesterol total, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, cálcio, cloreto, magnésio) utilizando *kits* reagentes comerciais desenvolvidos pela Gold Analisa Diagnóstica Ltda – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (Tab. 2).

TABELA 1 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS UTILIZADOS PARA AS ANÁLISES REALIZADAS NESTE TRABALHO.

T°C	T Exp	Constituintes plasmáticos								Substratos energéticos					Atividade enzimática							
		Glic	Ptna T	Alb	Coles	Trig	Ca	Cl	Mg	HB	Glc M	Glc F	Ptna F	Ptna M	G6Pase	LDH F	LDH M	MDH	FMDH M	CS	SOD F	SOD M
0	1 d	9	10	10	9	10	10	10	10	9	10	9	10	9	9	9	8	8	9	9	9	9
0	4 d	7	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	7	9	9	9	9
0	15 d	9	10	10	10	10	10	10	10	10	7	0	7	7	7	7	7	6	7	7	6	7
0	30 d	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	9	10	10	10	9	10	10	10	10	9	10
4	1 d	8	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	10	10	9	10	10	8	10	10	9	10
4	4 d	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	9	9	10	9	10	8	10	10
4	15 d	9	9	10	10	9	10	10	10	10	10	9	10	9	9	9	9	9	9	9	10	9
4	30 d	10	10	10	10	10	9	5	9	10	5	6	9	5	6	6	5	7	5	8	9	5
8	1 d	8	10	10	10	10	10	0	10	10	8	7	10	7	9	9	6	10	7	10	10	5
8	4 d	9	10	10	10	10	10	9	9	10	5	2	8	7	8	8	7	8	7	8	7	7

LEGENDA: T°C = temperatura do ensaio; T Exp = tempo de exposição; Glic = glicose; Ptna T = proteínas plasmáticas totais; Alb = albumina; Coles = colesterol; Trig = triglicerídeos; Ca = cálcio; Cl = cloro; Mg = magnésio; HB = hemoglobina; Glc M = glicogênio muscular; Glc F = glicogênio hepático; Ptna F = proteínas hepáticas; Ptna M = proteínas musculares; G6Pase = glicose-6-fosfatase; LDH F = lactato desidrogenase hepática; LDH M = lactato desidrogenase muscular; MDH F = malato desidrogenase hepática; MDH M = malato desidrogenase muscular; CS = citrato sintase; SOD F = superóxido dismutase hepática; SOD M = superóxido dismutase muscular.

3.4.2 Concentração dos substratos energéticos teciduais

A concentração de substratos energéticos do fígado e da musculatura branca epaxial de *Notothenia coriiceps* foi determinada para as diferentes situações experimentais. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), com a utilização de *kit* reagente comercial produzido pela Merck®, utilizando albumina bovina sérica como padrão, com $\lambda=595$ nm. A homogeneização foi feita em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 na proporção de 1g de tecido para 5mL de tampão com homogeneizador motorizado, sempre em banho de gelo. A concentração de glicogênio foi determinada de acordo com o método de Dubois et al. (1956), modificado por Bidinoto et al. (1997). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com $\lambda=480$ nm. O protocolo utilizado para determinação da concentração de glicogênio tecidual está detalhado no Anexo 1.

TABELA 2 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES PLASMÁTICOS DE *Notothenia coriiceps*. ADAPTADO DE RAGA, 2012.

Constituinte	Método	Padrão	λ (nm)
Proteínas Totais	Colorimétrico Biureto	albumina bovina 4,0 g/dL	545
Albumina	Colorimétrico Verde de Bromocresol	albumina bovina 3,8 g/dL e azida sódica 15,4 mmol/L	630
Glicose	Enzimático Colorimétrico (Trinder)	glicose 100 mg/dL	505
Colesterol	Enzimático Colorimétrico (Trinder)	colesterol 200 mg/dL e azida sódica 15 mmol/L.	500
Triglicerídeos	Enzimático Colorimétrico (Trinder)	triglicérides 200 mg/dL e azida sódica 6,9 mmol/L	505
Cálcio	Colorimétrico Cresolfaleína	cálcio 10 mg/dL e formol 0,1%	570
Cloreto	Colorimétrico Tiocianato	cloreto de sódio 100 mEq/L (100 mmol/L)	479
Magnésio	Colorimétrico Magon sulfonado	magnésio 2,0 mg/dL	505

FONTE: a autora (2012).

3.4.3 Atividade Enzimática

No tecido hepático, foi determinada a atividade das enzimas do metabolismo energético, glicose-6-fosfatase (G6Pase), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH) e citrato sintase (CS), e do estresse oxidativo, superóxido dismutase (SOD). A atividade da LDH, da MDH e da SOD

foi determinada também no tecido muscular. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata, em leitor de microplacas FLUOstar Optima (BMG Labtech).

Para a determinação da atividade enzimática, amostras de aproximadamente 0,1 g de tecido hepático e muscular foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 na proporção de 1g de tecido para 5mL de tampão com homogeneizador motorizado, sempre em banho de gelo. O homogeneizado foi sonicado em 3 ciclos de 2 segundos com intervalo de 8 segundos entre os ciclos, para rompimento de estruturas subcelulares, como mitocôndrias e retículo endoplasmático. O homogeneizado foi então centrifugado a 14000 g, 4°C, por 10 minutos. Amostras que apresentavam uma fase superior gordurosa muito volumosa ou se apresentavam muito turvas após centrifugação foram centrifugadas nas mesmas condições por mais 10 minutos, uma vez que o excesso de gordura e a turbidez poderiam interferir na determinação da atividade enzimática.

A atividade da G6Pase foi determinada através do método descontínuo que quantifica o fosfato inorgânico formado na reação. O sistema de reação é composto por tampão imidazol 100 mM pH 7,4, EDTA 1,8 mM, glicose-6-fosfato (G6P) 26,5 mM, sendo o pH ajustado para 6,5 após a adição de G6P. Após a incubação por 60 minutos na microplaca, a reação foi interrompida com a adição do reativo verde de malaquita constituído por molibdato de amônia 4,2%, verde de malaquita 0,045% e Tween 20 1%. Foi utilizada uma curva de referência com diferentes concentrações de fosfato e a leitura foi realizada em comprimento de onda (λ) de 600 nm. A determinação da atividade enzimática foi adaptada de Alegre et al. (1988) e o uso do reativo verde de malaquita para interromper a reação e identificar a formação de fosfato inorgânico foi adaptado de Fathi et al. (2002).

A atividade das enzimas LDH e MDH foi determinada através do consumo do NADH na reação, cujo pico de absorção é em 340 nm. Para a LDH, foi utilizado sistema de reação composto por tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, piruvato de sódio 1 mM, cloreto de potássio 100 mM e NADH 0,25 mM (THUESEN et al., 2005). Para a MDH, o sistema de reação é composto por tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, oxaloacetato 0,4 mM, cloreto de magnésio 20 mM e NADH 0,155 mM (CHILDRESS; SOMERO, 1979).

A atividade da CS foi determinada com base na reação da sulfidrilas reduzida da coenzima-A com o DTNB [5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico)] adicionado ao sistema de reação, composto por tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, cloreto de potássio 100 mM, EDTA 1 mM, DTNB 200 μ M e acetil coenzima-A (acetil-CoA) 200 μ M. A reação é iniciada com a adição de oxaloacetato em concentração final de 0,4 mM, com ajuste de pH para 7,4. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 410 nm (SABOROWSKI; BUCHHOLZ, 2002).

Para as enzimas G6Pase, LDH, MDH e CS, uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 μ mol de substrato em produto em 1 minuto.

O método para determinação da atividade da SOD se baseia na inibição da redução do NBT (do inglês, *nitro blue tetrazolium chloride*, cloreto de azul de nitrotetrazólio) para azul *formazan* provocada pelo radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. O sistema de reação é composto por tampão carbonato de sódio 100 mM pH 10,2, EDTA 0,017 mM e NBT 1 mM. A reação é iniciada com adição de hidroxilamina em concentração final de 37 mM. A leitura é feita a $\lambda = 560$ nm (CROUCH et al., 1981).

Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a redução do NBT para azul *formazan* em 1 minuto.

As atividades das enzimas foram normalizadas em função do conteúdo de proteínas totais teciduais obtido pelo método de Bradford (1976), sendo expressas em U.mg de proteína⁻¹.

3.4.4 Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) bifatorial para comparar as médias entre temperaturas e entre tempos de exposição. Os dados foram transformados em logaritmo ou raiz quadrada quando conveniente para atender às premissas do teste, porém a representação gráfica foi feita sempre com os dados originais, para melhor visualização. Nos casos em que estão ausentes os dados de algum tempo de exposição numa dada temperatura, todo o tratamento foi removido da análise para que fossem atendidas as premissas do teste (p. ex.

na ausência de dados de determinação da concentração de glicogênio hepático em 0°C por 15 dias). Por fim, foi aplicado o pós-teste de Tukey para comparação de médias par-a-par entre os tratamentos. Os testes estatísticos e transformações foram realizados no ambiente R, com auxílio do pacote R commander, e os gráficos foram elaborados no *software* GraphPad Prism 6.

4 RESULTADOS

Nos experimentos realizados, observou-se que os espécimes de *N. coriiceps* sobreviveram em todos os tempos de exposição (1, 4, 15 e 30 dias) nas temperaturas de 0°C e 4°C. Em 8°C, os indivíduos não resistem por um período maior do que 6 dias, de forma que foram utilizados para análise somente espécimes expostos por 1 e 4 dias a esta temperatura.

Visando facilitar a descrição e representação gráfica dos resultados e posterior discussão, os experimentos foram divididos em dois grupos: Exposição a 0°C e 4°C por 1, 4, 15 e 30 dias e Exposição a 0°C, 4°C e 8°C por 1 e 4 dias.

No Anexo 2 encontram-se os resultados da ANOVA resumidos, indicando os valores de F e o valor de p associado (Tabelas 3 e 4).

4.1 EXPOSIÇÃO A 0°C E 4°C POR 1, 4, 15 E 30 DIAS

4.1.1 Constituintes Plasmáticos

A glicemia dos animais mantidos em 0°C sofreu uma diminuição aos 30 dias de exposição, quando comparada com os demais tempos de exposição (Fig. 5A). Já nos animais expostos à temperatura de 4°C, a glicemia aumentou significativamente aos 30 dias de exposição. Nos tempos de exposição de 1 e 15 dias, a glicemia dos animais expostos a 0°C é maior em relação àqueles expostos a 4°C, não havendo diferença no tempo de 4 dias. Em 30 dias, no entanto, a glicemia exibida pelos animais expostos a 4°C foi maior que dos animais a 0°C (Fig. 5A).

Não houve diferença na concentração plasmática de colesterol dos animais mantidos a 0°C nos períodos de 1, 4 e 15 dias, havendo, em 30 dias, uma redução quando comparada às médias de 1 e 4 dias (Fig. 5B). Expostos a 4°C, os animais apresentaram colesterolemia reduzida, com exceção de 15 dias, em que apresentaram a maior média, sendo esta semelhante ao grupo mantido a 0°C pelo mesmo período de tempo (Fig. 5B). A colesterolemia dos animais mantidos por 1 e 4 dias em 4°C é menor que a dos animais mantidos pelo mesmo período de tempo a 0°C (Fig. 5B).

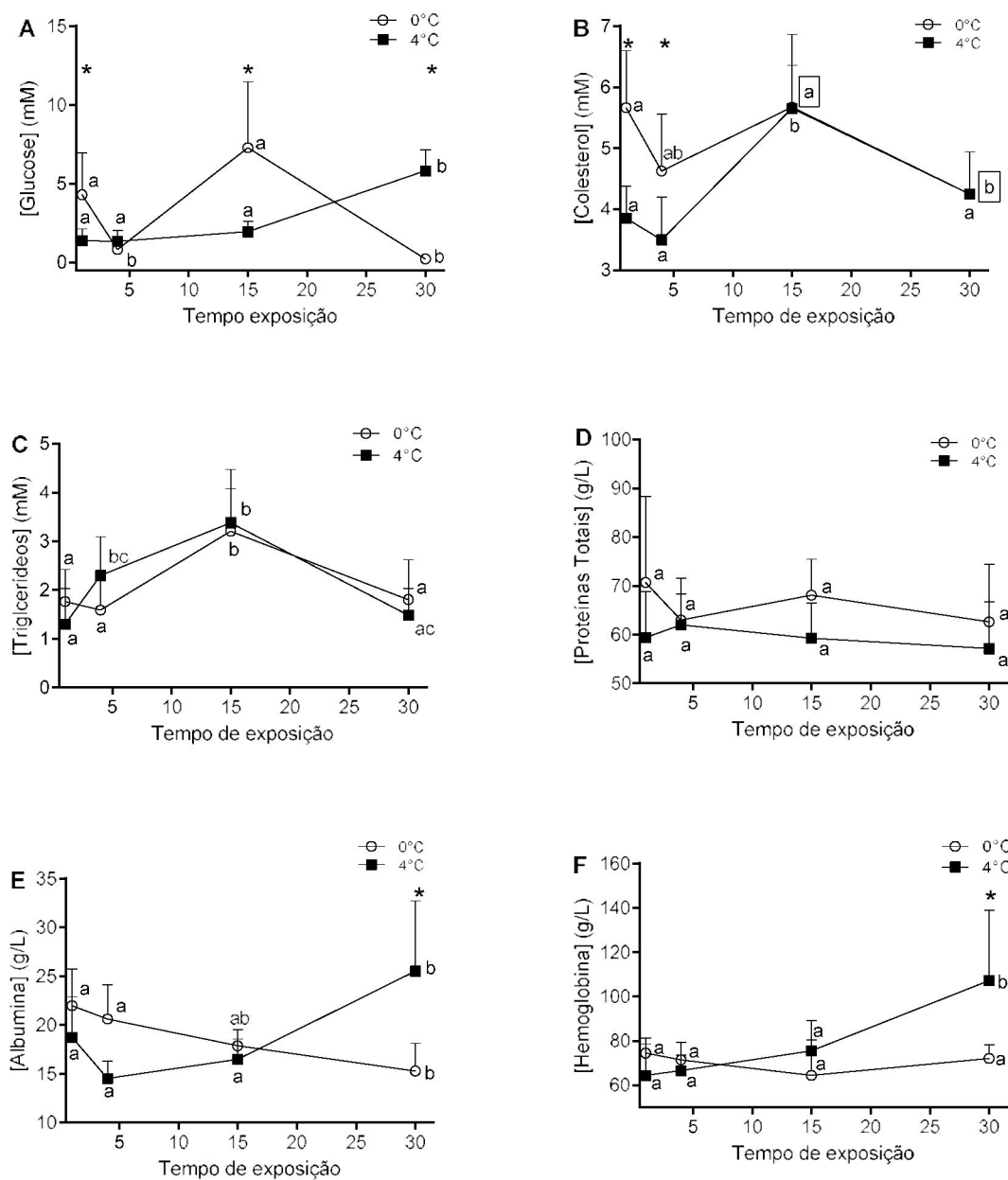
A concentração plasmática de triglicerídeos não apresentou diferenças entre os animais mantidos a 0°C por 1 e 4 dias, porém aumentou em 15 dias, e foi reduzida novamente em 30 dias de exposição, nesta mesma temperatura (Fig. 5C). Em 4°C a concentração de triglicerídeos aumentou ao longo do tempo até 15 dias, sendo que em 30 dias esta foi reduzida a um nível próximo ao observado em 1 dia. Não houve diferença significativa na concentração de triglicerídeos entre os animais expostos a 0°C e 4°C num dado tempo de exposição (Fig. 5C).

A concentração de proteínas totais do sangue não apresentou variação significativa em 0°C e 4°C ao longo dos tempos de exposição e entre os animais expostos a 0°C e 4°C num dado tempo de exposição (Fig. 5D). Já, a concentração de albumina apresentou uma tendência à redução ao longo do tempo nos animais expostos a 0°C, ao passo que em 4°C os animais exibiram a concentração de albumina estável por 1, 4 e 15 dias, havendo um aumento em 30 dias (Fig. 5E). Somente se observa diferença na concentração de albumina entre 0°C e 4°C em 30 dias de exposição, sendo a maior concentração observada em 4°C (Fig. 5E).

A concentração de hemoglobina não sofreu alterações ao longo do tempo nos animais mantidos a 0°C. Até 15 dias, em 4°C, a concentração de hemoglobina também permanece estável e em valores semelhantes ao observado em 0°C, porém há um aumento na concentração em 30 dias nesta temperatura. Neste período, a concentração em 4°C é maior que em 0°C (Fig. 5F).

A concentração plasmática de cálcio apresentou um pico em 15 dias nos animais mantidos em 0°C. Em 4 e 30 dias se observa valores intermediários entre o mais baixo, encontrado em 1 dia, e o mais alto, em 15 dias (Fig. 6A). Já em 4°C, a concentração deste íon permanece estável até 15 dias, havendo um aumento em 30 dias. Em 1 e 4 dias, não há diferença na concentração de cálcio entre os animais mantidos em 0°C e 4°C, porém em 15 dias este valor é maior em 0°C e em 30 dias é maior em 4°C (Fig. 6A).

FIGURA 5. VARIAÇÃO DOS METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE EM 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.



FONTE: a autora (2012).

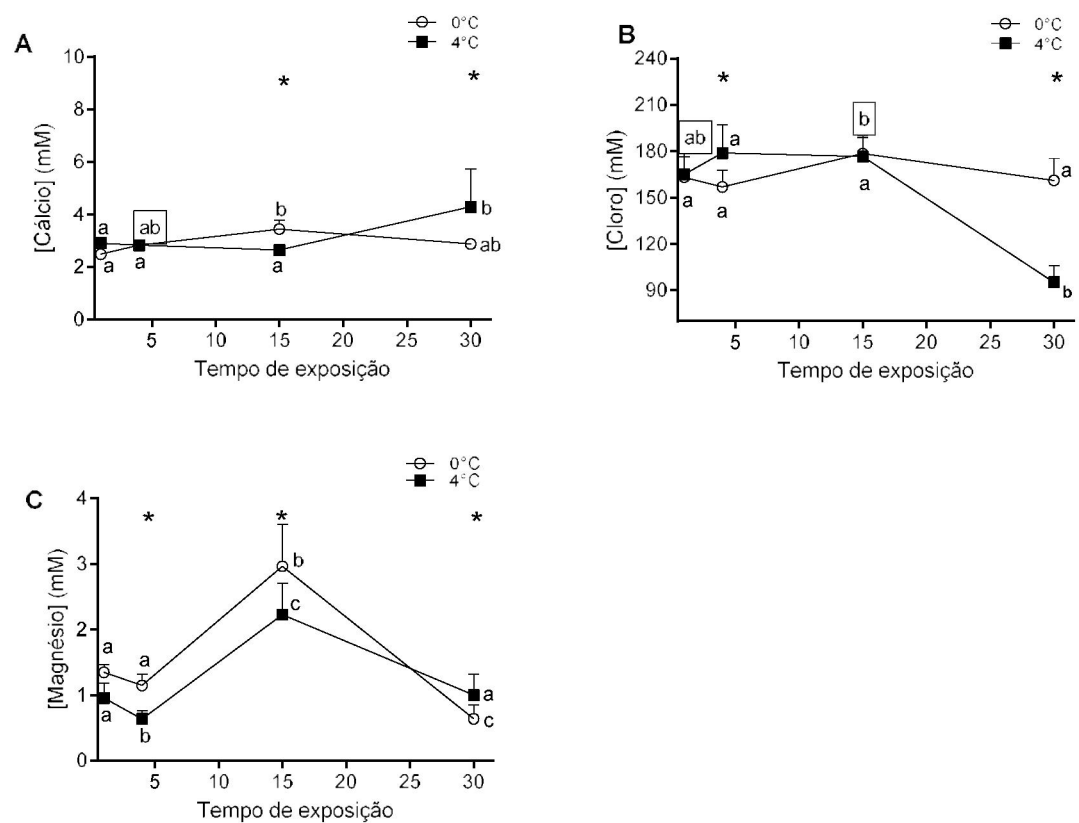
NOTA: Os valores estão representados pela média ± DP. O número amostral de cada análise está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes ao longo do tempo em 0°C ou 4°C de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Letras contidas na caixa de texto se referem à média da temperatura de 0°C quando esta não está aparente. Diferenças significativas entre 0°C e 4°C no mesmo tempo de exposição são indicadas por asterisco.

A concentração de cloreto não variou em 0°C, com exceção dos animais mantidos por 15 dias, cuja concentração foi maior que nos demais tempos de exposição. Em 4°C, a concentração de cloreto foi semelhante entre

os animais mantidos por até 15 dias, havendo uma drástica redução em 30 dias de exposição (Fig. 6B). Em 4 dias de exposição, a concentração média de cloreto dos animais mantidos a 0°C foi menor que a dos mantidos em 4°C. Em 30 dias, a média dos animais em 4°C foi bastante reduzida em comparação com 0°C pelo mesmo período (Fig. 6B). Nos demais tempos de exposição, a variação na concentração de cloreto não foi significativa (Fig. 6B).

A concentração de magnésio apresentou um aumento significativo em 15 dias de exposição a 0°C, comparada a 1 e 4 dias. O nível deste íon voltou a ser reduzido em 30 dias. O mesmo comportamento foi observado em 4°C, porém com médias menores que 0°C em 1, 4 e 15 dias de exposição (Fig. 6C). Em 30 dias, a concentração de magnésio em 0°C é menor que em 4°C.

FIGURA 6. VARIAÇÃO DOS ELETRÓLITOS PLASMÁTICOS NÃO PROTEICOS DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE EM 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.



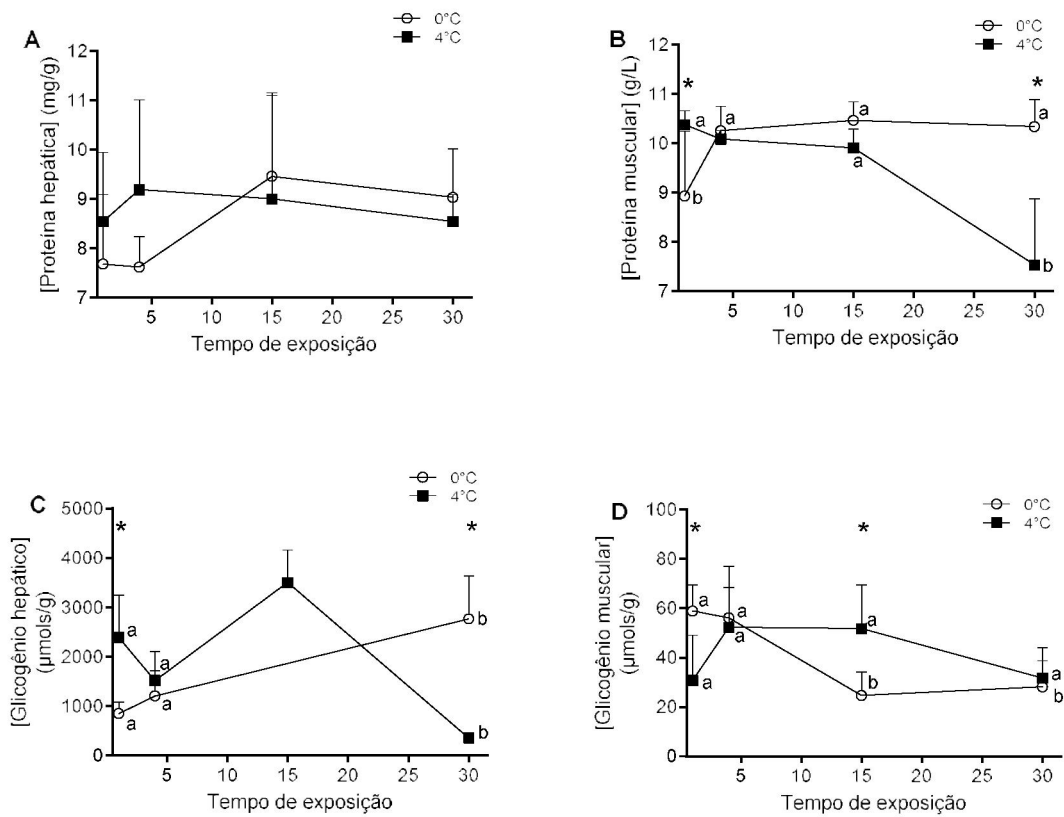
FONTE: a autora (2012).

NOTA: Os valores estão representados pela média ± DP. O número amostral de cada análise está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Letras contidas na caixa de texto referem-se à média da temperatura de 0°C quando esta não está aparente. Diferenças significativas entre 0°C e 4°C no mesmo tempo de exposição são indicadas por asterisco.

4.1.2 Concentração Dos Substratos Energéticos Teciduais

A concentração de proteínas hepáticas não apresentou variação significativa ao longo do tempo nas temperaturas de 0°C e 4°C (Fig. 7A). Também não houve variação entre 0°C e 4°C num dado tempo de exposição (Fig. 7A).

FIGURA 7. VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS (A E B) E DE GLICOGÊNIO (C E D) DOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE EM 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.



FONTE: a autora (2012).

NOTA: Os valores estão representados como média ± DP. O número amostral de cada análise está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Diferenças significativas entre 0°C e 4°C no mesmo tempo de exposição são indicadas por asterisco.

A concentração de proteínas musculares apresentou um aumento nos animais expostos a 0°C por 4 dias, quando comparados a 1 dia, e permaneceu neste nível em 15 e 30 dias de exposição. Já em 4°C, os níveis de proteínas musculares foram semelhantes aos dos animais expostos a 0°C por 1, 4 e 15 dias, havendo uma drástica redução em 30 dias (Fig. 7B). Os animais mantidos

em 0°C por 1 dia apresentaram concentração média de proteínas musculares menor que os mantidos em 4°C pelo mesmo período, ao passo que em 30 dias a menor concentração média foi observada em 4°C (Fig. 7B).

Devido a indisponibilidade de amostra suficiente para os procedimentos analíticos, não há resultados referentes à concentração de glicogênio hepático em 15 dias de exposição a 0°C. O conteúdo de glicogênio hepático aumentou em 30 dias quando comparado a 1 e 4 dias de exposição na temperatura de 0°C (Fig. 7C). Em 4°C, o conteúdo de glicogênio é semelhante por 1 e 4 dias, havendo um aumento em 15 dias, seguido de uma sensível queda em 30 dias (Fig. 7C). Em 1 dia, os animais mantidos em 0°C apresentaram menor concentração de glicogênio hepático quando comparados aos animais mantidos em 4°C pelo mesmo período. Em 4 dias, não é observada diferença entre os animais expostos às diferentes temperaturas. Porém, em 30 dias de exposição a maior concentração de glicogênio hepático é observada em 0°C, sendo aproximadamente 5 vezes maior que a concentração observada em 4°C neste período.

No tecido muscular, a concentração de glicogênio diminuiu ao longo do tempo em 0°C, sendo que os valores entre 1 e 4 dias e 15 e 30 dias não apresentaram diferenças significativas (Fig. 7D). Em 4°C, não houve variação significativa ao longo do tempo de exposição (Fig. 7D). Entre 0°C e 4°C foi observada diferença significativa somente entre 1 e 15 dias de exposição, sendo que a maior média encontrada em 1 dia foi em 0°C e em 15 dias foi em 4°C (Fig. 7D).

4.1.3 Atividade Enzimática

A enzima hepática citrato sintase (CS) não exibiu variação significativa de sua atividade em 0°C e 4°C ao longo dos tempos de exposição nem entre os animais expostos a 0°C e 4°C num dado tempo de exposição (Fig. 8A).

Não houve variação na atividade da enzima hepática glicose-6-fosfatase (G6Pase) entre os tempos de exposição nos animais mantidos a 0°C. Nos animais mantidos a 4°C, a atividade da G6Pase apresentou uma queda nos tratamentos em 4 e 15 dias, comparados ao tratamento de 1 dia, aumentando novamente sua atividade em 30 dias (Fig. 8B). Não existem

diferenças significativas entre os grupos mantidos a 0°C e a 4°C num dado tempo de exposição (Fig. 8B).

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) hepática não apresentou variação entre os tempos de exposição nos animais mantidos em 0°C. Houve aumento significativo da atividade da LDH somente nos animais expostos a 4°C por 30 dias (Fig.8C). Comparando as temperaturas testadas, existe variação significativa somente em 30 dias, quando a atividade da LDH hepática é maior em 4°C do que em 0°C (Fig. 8C).

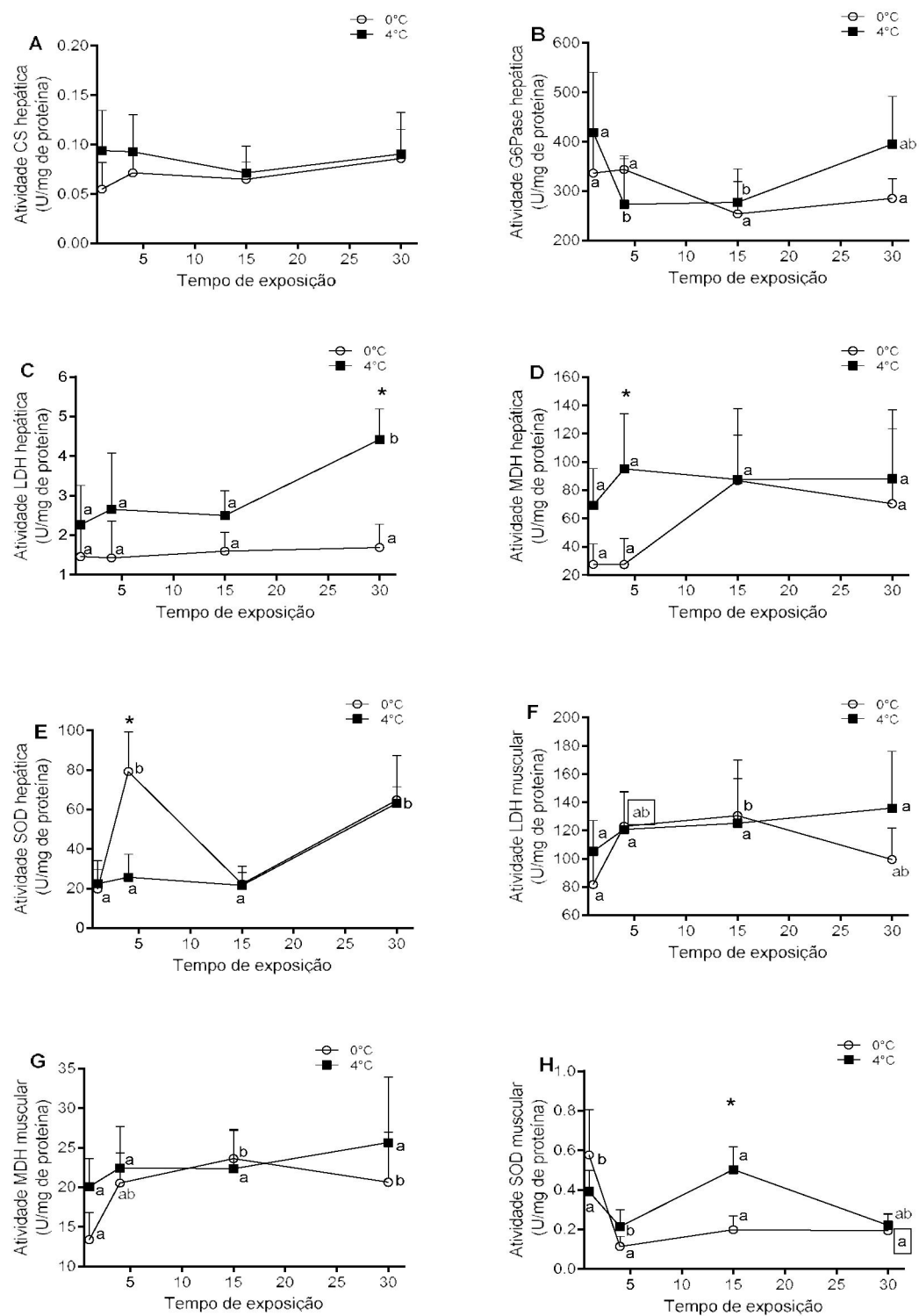
A atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) hepática não apresentou variação entre os tempos de exposição em 0°C e em 4°C, sendo significativamente maior somente em 4 dias a 4°C, quando comparada a 0°C (Fig. 8D).

A superóxido dismutase (SOD) hepática apresentou um comportamento oscilante entre os tempos de exposição nos animais mantidos a 0°C, sendo que a atividade em 4 dias aumentou significativamente se comparada à atividade em 1 dia, foi reduzida em 15 dias e voltou a aumentar em 30 dias de exposição. No tratamento a 4°C, a atividade desta enzima não foi alterada entre 1, 4 e 15 dias, havendo um aumento significativo em 30 dias (Fig. 8E). Em 4 dias, a atividade da SOD hepática foi significativamente maior em 0°C do que em 4°C, não havendo diferenças entre as temperaturas nos outros tempos de exposição (Fig. 8E).

A atividade da LDH muscular apresentou um pequeno aumento nos tempos de 4 e 15 dias de exposição a 0°C, quando comparada a 1 dia nesta temperatura. Em 30 dias, houve uma ligeira queda na atividade desta enzima. Nos animais expostos a 4°C, não houve alteração significativa na atividade desta enzima (Fig. 8F). Não houve diferenças entre os animais expostos a 0°C e 4°C num dado tempo de exposição (Fig. 8F).

A MDH muscular apresentou uma tendência a aumentar sua atividade entre os animais mantidos a 0°C, e este aumento é estabilizado entre 15 e 30 dias de exposição. Nos animais mantidos a 4°C não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de exposição (Fig. 8G). Comparando as médias na atividade da MDH muscular entre animais expostos a 0°C e 4°C, não foi observada diferença significativa num dado tempo de exposição (Fig. 8G).

FIGURA 8. VARIAÇÃO NA ATIVIDADE DO METABOLISMO ENERGÉTICO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM FÍGADO E MÚSCULO DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS A 4°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1, 4, 15 E 30 DIAS



FONTE: a autora (2012).

NOTA: Os valores estão representados como média ± DP. O número amostral das análises está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Letras contidas na caixa de texto se referem à temperatura de 0°C quando esta não está aparente. Diferenças significativas entre 0°C e 4°C no mesmo tempo de exposição são indicadas por asterisco.

A SOD muscular apresentou uma queda na atividade entre os animais mantidos a 0°C por 1 e 4 dias, sendo este valor médio mantido nos tratamentos por 15 e 30 dias. Nos animais mantidos a 4°C, houve uma queda entre 1 e 4 dias, um aumento em 15 dias e uma leve queda em 30 dias de exposição (Fig. 8H). Em 15 dias de exposição, foi observada uma maior atividade da SOD nos animais mantidos a 4°C, comparados aos animais mantidos a 0°C (Fig. 8H).

4.2 EXPOSIÇÃO A 0°C, 4°C E 8°C POR 1 E 4 DIAS

4.2.1 Constituintes Plasmáticos

Houve diferença significativa entre a glicemia média dos animais mantidos a 0°C e 8°C entre 1 e 4 dias de exposição (Fig. 9A). A glicemia dos animais mantidos por 1 dia é diferente entre 0°C, 4°C e 8°C, sendo a maior média encontrada em 8°C e a menor em 4°C (Fig. 9A). Entre os animais mantidos por 4 dias, a maior média também foi observada em 8°C, sendo as médias em 0°C e 4°C semelhantes.

A concentração de colesterol plasmático apresentou diminuição significativa entre os tempos de exposição em 8°C, não havendo diferença entre os tempos de exposição em 0°C e 4°C (Fig. 9B). Tanto em 1 como em 4 dias de exposição, a maior concentração média foi observada em 0°C e a menor em 4°C (Fig. 9B).

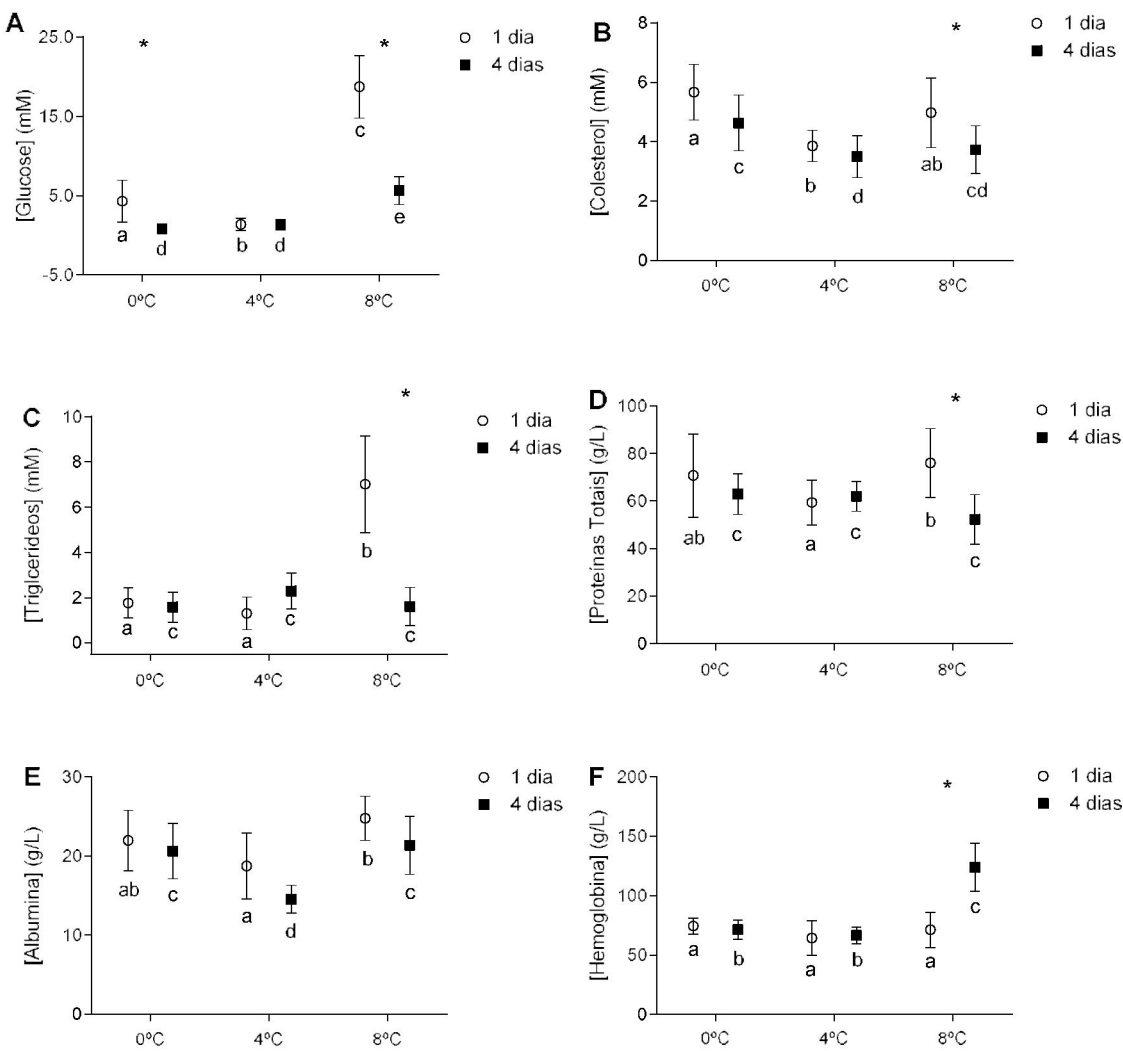
Houve diminuição significativa da concentração de triglicerídeos plasmáticos entre os tempos de exposição somente nos animais expostos a 8°C. Não foram observadas diferenças significativas nos animais expostos a 0°C e 4°C (Fig. 9C). Em 1 dia de exposição, os animais apresentam a concentração média de triglicerídeos maior em 8°C, comparado a 0°C e 4°C. Não houve diferença nos animais mantidos por 4 dias nas três temperaturas testadas (Fig. 9C).

A concentração de proteínas totais não variou entre os tempos de exposição em 0°C e 4°C, apresentando uma diminuição em 8°C ao longo do tempo (Fig. 9D). Em 1 dia de exposição, a maior concentração média de proteínas foi observada em 8°C, e a menor em 4°C (Fig. 9D). Em 4 dias de

exposição, não houve diferença na concentração de proteínas dos animais mantidos em diferentes temperaturas (Fig. 9D).

A concentração de albumina plasmática não variou entre os tempos de exposição em 0°C, 4°C e 8°C, nem entre as temperaturas em 1 dia de exposição (Fig. 9E). Já os animais mantidos em 4°C por 4 dias apresentaram concentração de albumina menor que os mantidos em 0°C e 8°C (Fig. 9E).

FIGURA 9. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.



FONTE: a autora (2012).

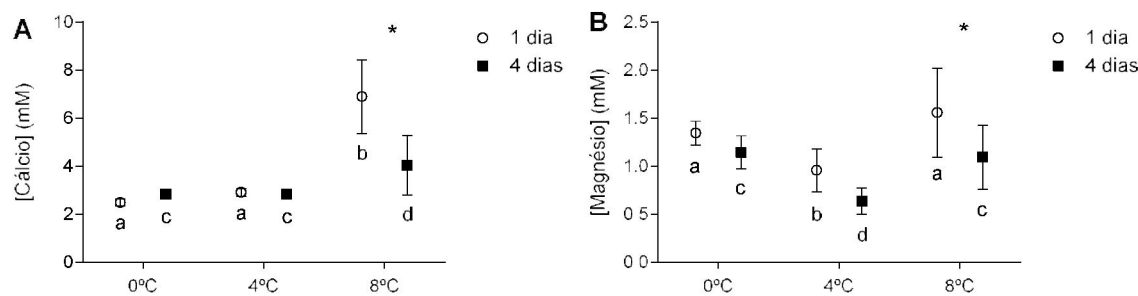
NOTA: Os valores estão representados pela média \pm DP. O número amostral de cada análise está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes entre 0°C, 4°C e 8°C no mesmo tempo de exposição, de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Diferenças significativas entre os tempos de exposição na mesma temperatura são indicadas por asterisco.

Foi observado um aumento significativo na concentração de hemoglobina dos animais mantidos a 8°C por 4 dias, em comparação aos mantidos por 1 dia (Fig. 9F). Em 0°C e 4°C não houve diferença entre os tempos de exposição. A concentração média de hemoglobina foi semelhante nos animais mantidos por 1 dia em 0°C, 4°C e 8°C, porém em 4 dias, os animais expostos a 8°C apresentaram a maior concentração de hemoglobina. (Fig. 9F).

A concentração de cálcio apresentou uma diminuição significativa ao longo do tempo nos animais expostos a 8°C, não havendo variação nos animais expostos a 0°C e 4°C (Fig. 10A). Tanto nos animais mantidos por 1 dia quanto nos mantidos por 4 dias, as maiores concentrações médias de cálcio são observadas em 8°C, não havendo diferença significativa entre os grupos mantidos em 0°C e 4°C (Fig. 10A).

A concentração de magnésio não apresentou diferença significativa entre os tempos de exposição nos animais mantidos a 0 e 4°C, exibindo uma diminuição ao longo do tempo em 8°C (Fig. 10B). Em 1 dia de exposição a menor concentração média foi observada em 4°C, o mesmo ocorrendo para 4 dias de exposição. A concentração média dos animais mantidos por 0 e 8°C em cada tempo de exposição foi semelhante (Fig. 10B).

FIGURA 10. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS ELETRÓLITOS PLASMÁTICOS NÃO PROTEICOS DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.



FONTE: a autora (2012).

NOTA: Os valores estão representados pela média ± DP. O número amostral de cada análise está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes entre 0°C, 4°C e 8°C no mesmo tempo de exposição, de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Diferenças significativas entre os tempos de exposição na mesma temperatura são indicadas por asterisco.

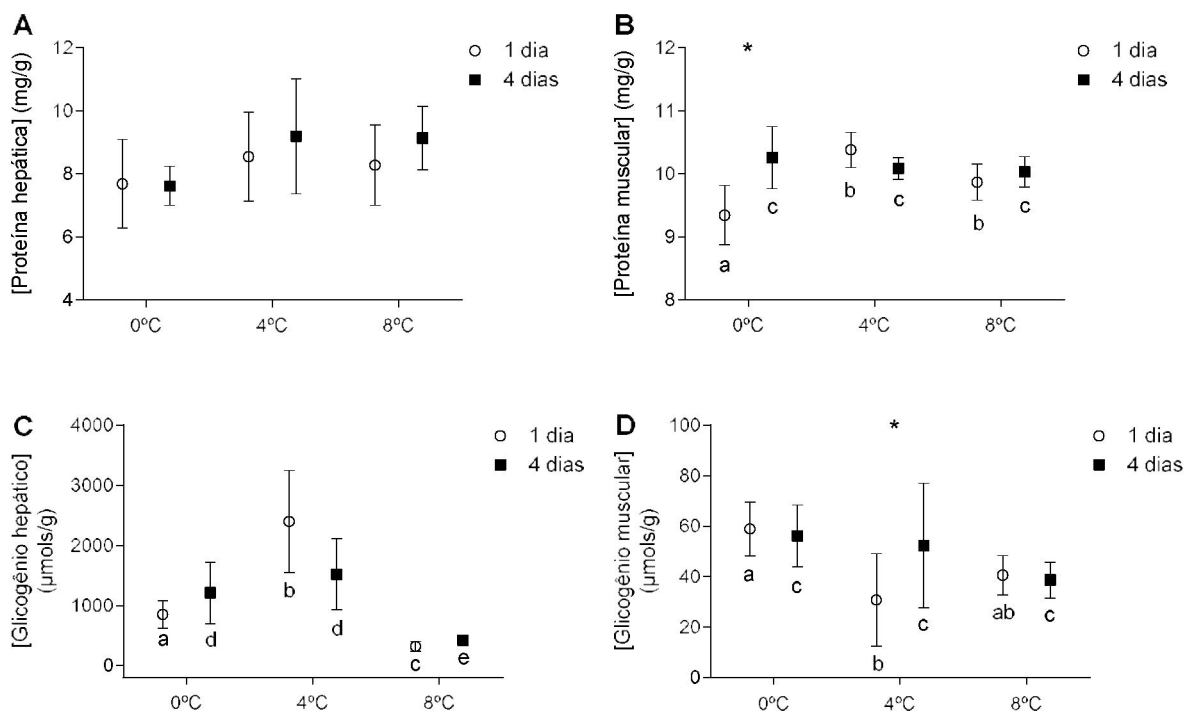
4.2.2 Concentração Dos Substratos Energéticos Teciduais

A concentração de proteínas hepáticas não apresentou variação significativa ao longo do tempo nas três temperaturas testadas nem entre temperaturas num dado tempo de exposição. (Fig. 11A).

No tecido muscular, a concentração de proteínas apresentou um aumento significativo ao longo do tempo somente nos animais mantidos em 0°C, não exibindo variação significativa nas demais temperaturas (Fig. 11B). Em 1 dia de exposição, a menor concentração foi observada em 0°C, não havendo diferença na média dos animais mantidos em 4°C e 8°C. Já em 4 dias de exposição, os animais mantidos em 0°C apresentaram a maior concentração média de proteínas, novamente sem diferença entre os grupos mantidos em 4°C e 8°C (Fig. 11B).

A concentração de glicogênio hepático não apresentou variação ao longo do tempo em 0°C, 4°C e 8°C (Fig. 11C). Em 1 dia de exposição, a concentração de glicogênio é diferente entre todas as temperaturas testadas, sendo a maior concentração observada em 4°C e a menor em 8°C. Já em 4 dias de exposição, somente a concentração média dos animais mantidos em 8°C é significativamente menor (Fig. 11C).

FIGURA 11. VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS TOTAIS (A E B) E DE GLICOGÊNIO (C E D) DOS TECIDOS HEPÁTICO E MUSCULAR DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.



FONTE: a autora (2012).

NOTA: Os valores estão representados como média \pm DP. O número amostral de cada análise está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes entre 0°C, 4°C e 8°C no mesmo tempo de exposição, de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Diferenças significativas entre os tempos de exposição na mesma temperatura são indicadas por asterisco.

Foi observado um aumento significativo ao longo do tempo na concentração de glicogênio muscular nos animais mantidos em 4°C, não havendo diferenças temporais nos animais mantidos em 0°C e 8°C (Fig. 11D). Em 1 dia de exposição, os animais mantidos a 0°C exibiram a maior concentração média de glicogênio, ao passo que os animais em 4°C exibiram a menor concentração. Ambas as temperaturas não diferem significativamente da concentração média dos animais mantidos em 8°C. Não foi observada diferença na concentração de glicogênio entre animais mantidos por 4 dias nas três temperaturas testadas (Fig. 11D).

4.2.3 Atividade Enzimática

Não houve diferenças significativas ao longo do tempo, em nenhuma temperatura testada na atividade da enzima hepática citrato sintase (CS) (Fig. 12A). Também não foi observada diferença entre os grupos mantidos nas três temperaturas por 1 dia. Em 4 dias de exposição os animais mantidos em 8°C exibiram a maior atividade desta enzima, enquanto em 0°C exibiram a menor atividade. Os animais mantidos em 4°C não diferem sua atividade dos demais mantidos por 4 dias em 0°C e 8°C (Fig. 12A).

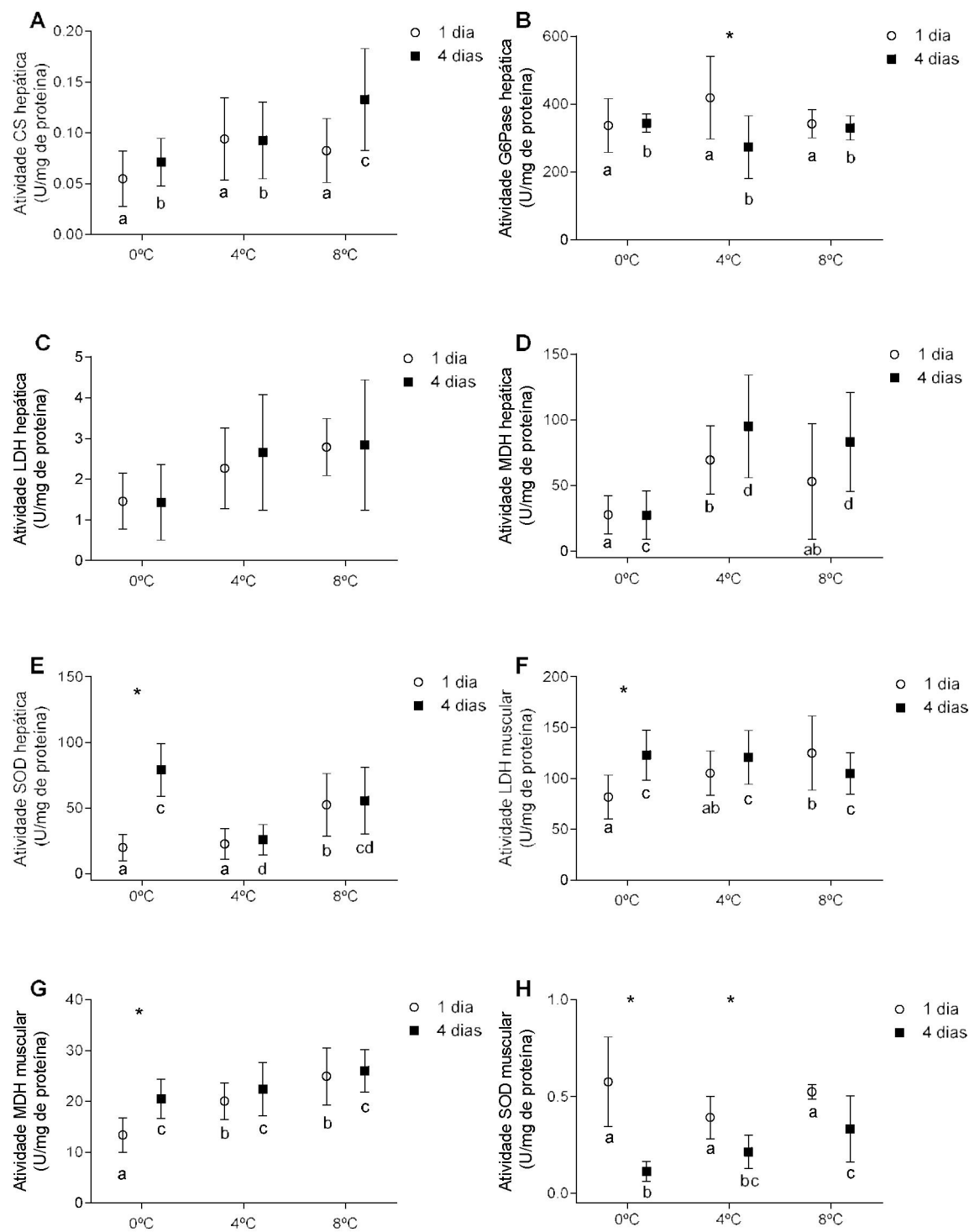
No tecido hepático, a glicose-6-fosfatase (G6Pase) exibiu uma diminuição significativa ao longo do tempo somente em 4°C, não havendo diferença em 0°C e 8°C (Fig. 12B). Tanto em 1 quanto em 4 dias de exposição não há diferença entre os grupos mantidos em 0°C, 4°C e 8°C (Fig. 12B)

Não foi observada variação ao longo do tempo e entre temperaturas na atividade da lactato desidrogenase (LDH) hepática (Fig. 12C).

A malato desidrogenase (MDH) hepática não exibiu diferenças significativas ao longo do tempo numa dada temperatura, mas sua atividade aumentou em 4 dias de exposição a 4°C e a 8°C em relação ao controle (Fig. 12D). Tanto em 1 quanto em 4 dias de exposição, foi observada maior atividade da MDH em 4°C e menor em 0°C. A atividade desta enzima em 8°C não difere do controle em 1 dia exposição, porém, dada a variação individual, também não difere do encontrado em 4°C (Fig. 12D).

A superóxido dismutase (SOD) hepática exibiu um aumento significativo na atividade somente em 0°C, não havendo variação ao longo do tempo em 4°C e 8°C (Fig. 12E). Mantidos por 1 dia, os animais exibiram maior atividade da SOD em 8°C em comparação a 0°C e 4°C, que são semelhantes. Em 4 dias, a maior atividade foi observada em 0°C, sendo a atividade em 4°C e 8°C semelhantes (Fig. 12E).

FIGURA 12. VARIAÇÃO NA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM FÍGADO E MÚSCULO DE *Notothenia coriiceps* SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR AQUECIMENTO NAS TEMPERATURAS 4°C E 8°C, COM O RESPECTIVO CONTROLE A 0°C, POR 1 E 4 DIAS.



FONTE: a autora (2012).

LEGENDA: Os valores estão representados como média \pm DP. O número amostral de cada análise está descrito na Tabela 1. Diferentes letras representam valores significativamente diferentes entre 0°C, 4°C e 8°C no mesmo tempo de exposição, de acordo com o pós-teste de Tukey ($\alpha = 0,95$). Diferenças significativas entre os tempos de exposição na mesma temperatura são indicadas por asterisco.

No tecido muscular, a LDH apresentou aumento da sua atividade entre 1 e 4 dias no tratamento controle (0°C). Não há alteração na atividade da enzima entre 1 e 4 dias entre os tratamentos a 4°C e 8°C (Fig. 12F). A atividade da enzima nos animais mantidos a 8°C por 1 dia é maior que a dos animais mantidos a 0°C pelo mesmo tempo, sendo que a atividade em 4°C foi semelhante aos dois extremos de temperatura (Fig. 12F). Em 4 dias de exposição não houve diferenças significativas entre as temperaturas testadas (Fig. 12F).

A MDH muscular apresentou aumento da sua atividade entre 1 e 4 dias de exposição ao tratamento controle, não havendo diferenças entre tempos de exposição nas temperaturas de 4°C e 8°C (Fig. 12G). Em 1 dia de exposição, a atividade da MDH em 4°C e 8°C é semelhante e ambas são maiores que a atividade em 0°C (Fig. 12G). Já em 4 dias de exposição, não houve diferença significativa entre 0°C, 4°C e 8°C (Fig. 12G).

A SOD muscular diminuiu sua atividade ao longo do tempo nas temperaturas controle (0°C) e 4°C (Fig. 12H). Não houve diferença entre as temperaturas em 1 dia de exposição, mas em 4 dias de exposição foi observado um aumento na atividade de acordo com o aumento de temperatura (Fig. 12H).

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que *Notothernia coriiceps* não é capaz de ajustar seu metabolismo por muito tempo em 8°C, fato comprovado pela morte dos animais em períodos superiores a 5 dias nesta temperatura, embora haja uma capacidade de aclimação à temperatura de 4°C ao longo do tempo. O limite letal de temperatura em nototheniídeos antárticos tem sido estabelecido entre 5 e 6°C, sob condições diferentes deste estudo (SOMERO; DEVRIES, 1967). Um estudo semelhante foi realizado com *Notothernia rossii*, no qual se demonstrou que esta espécie possui uma capacidade de ajuste superior à de *N. coriiceps*, sendo capaz de sobreviver por 30 (EUGÊNIO, 2012) e até 90 dias em 8°C (dados não publicados). Contudo, Bilyk e DeVries (2011) demonstraram que o máximo térmico crítico (CTMax², do inglês *critical thermal maximum*) de *N. coriiceps* é um dos maiores entre vários teleósteos antárticos estudados. Logo, embora *N. coriiceps* seja capaz de suportar um aumento gradual de 0,3°C/min da temperatura, atingindo 16,17°C (BILYK; DEVRIES, 2011), neste trabalho a sua capacidade de ajuste é comprometida quando submetido a choque térmico em 8°C por um período maior que 5 a 6 dias. Isso demonstra que, em situação de choque térmico, *N. coriiceps* é mais sensível, exibindo alterações importantes mais evidentemente e, portanto, sendo uma espécie com bom potencial para ser bioindicadora de alterações ambientais.

Para organismos ectotérmicos, a temperatura é o principal fator abiótico limitante no ambiente, uma vez que determina a velocidade de reações químicas e a estabilidade de macromoléculas, os quais, por sua vez, influenciam todos os sistemas fisiológicos. No caso de ectotérmicos antárticos, cujo ambiente é altamente estável em termos de temperatura, variações ambientais podem ser particularmente impactantes, uma vez que estes organismos podem ter perdido sua capacidade de ajuste como compensação pela adaptação metabólica ao frio (WOHLSHLAG, 1960; HOCHACHKA; SOMERO, 1968; WEINSTEIN; SOMERO, 1998). Porém, embora a tolerância aguda ao calor em organismos antárticos seja menor que em organismos

² O CTMax é uma medida de tolerância aguda, baseada no aumento rápido porém gradual da temperatura até que o animal perca consistentemente o equilíbrio (PALADINO et al., 1980 *apud* BILYK; DEVRIES, 2011).

tropicais ou temperados, tem sido demonstrado que existe uma capacidade de aclimação a temperaturas superiores à média ambiental (SEEBACHER et al., 2005; PODRABSKI; SOMERO, 2006; HUDSON et al., 2008). *Pagothenia borchgrevinki*, um peixe criopelágico, cujo hábitat é coberto por gelo durante a maior parte do ano, é capaz de sobreviver por até 16 semanas a 4°C, sendo capaz de tolerar até 14°C após aclimação a 4°C (PODRABSKI; SOMERO, 2006), além de compensações em vários níveis, como na *performance* de natação e na atividade de enzimas dos metabolismos aeróbio e anaeróbio (SEEBACHER et al., 2005). No presente estudo, diversas compensações metabólicas ao aumento de temperatura ao longo do tempo foram demonstradas em *N. coriiceps*, sendo estas discutidas abaixo.

Considera-se que a fase inicial da aclimação ao calor pode causar déficit de oxigênio nos órgãos centrais, quando o aumento na taxa metabólica dependente da temperatura excede a capacidade de transporte de oxigênio (PÖRTNER, 2002). Assim, um maior aporte de ATP pela via anaeróbia é fundamental para a manutenção das funções vitais do animal, até que o organismo possa restabelecer um suprimento tecidual de oxigênio adequado, seja pelo aumento do hematócrito ou pelo aumento na concentração de hemoglobina (HEISE; ABELE, 2008). Em um estudo envolvendo a aclimação de *N. coriiceps* a 5°C por até 14 dias, Heise e Abele (2008) sugerem que a regulação positiva da formação de lactato anaeróbio nas primeiras 48 horas de aquecimento pode ser considerada uma resposta primária de compensação do déficit energético, até que a capacidade de transporte de oxigênio melhore, se tornando adequada à nova demanda energética, o que, segundo as autoras, ocorre em cerca de 7 dias. No presente estudo, a concentração de hemoglobina de *N. coriiceps* em 4°C apresentou um aumento somente em 30 dias de exposição, o que indica que, nesta temperatura, os animais poderiam estar utilizando outros mecanismos para suprir o déficit no transporte de oxigênio, como transcrição de diferentes tipos de hemoglobina com maior afinidade pelo oxigênio ou diminuição da taxa metabólica, ou que o ajuste ocorreria somente a longo prazo. Já em 8°C, o aumento na concentração de hemoglobina é evidente nos 4 primeiros dias de exposição, indicando uma necessidade urgente de ajuste para compensar o aumento agudo da

temperatura mantendo a atividade aeróbica, o que se mostra ineficiente, dado que o animal morre em 5 a 6 dias.

A tolerância térmica dos organismos e suas consequências nos sistemas enzimáticos tem relação com a perda do equilíbrio entre a demanda e o suprimento de oxigênio nos tecidos, uma vez que a demanda energética aumenta com o aumento da temperatura (MARK et al., 2002). Desta forma, a regulação dos processos responsáveis pela produção de energia é fundamental para manter um suprimento adequado de ATP nos tecidos (SEEBACHER et al., 2005). Neste estudo, a concentração de LDH no tecido hepático aumentou somente em 30 dias de exposição a 4°C, da mesma forma que a concentração de hemoglobina. Considerando que a LDH hepática tende a disponibilizar lactato, que pode ser direcionado ao metabolismo aeróbio (CARVALHO et al., 1998), este comportamento poderia indicar uma retomada do metabolismo aeróbio hepático, já que o suprimento de oxigênio passaria a ser favorecido pela maior produção de hemoglobina. Contudo, as demais enzimas testadas envolvidas no metabolismo aeróbio hepático – CS e MDH – não exibiram alteração na sua concentração em nenhuma das situações experimentais, contrariando a hipótese de incremento aeróbio. Diante disso, é possível que o aumento de concentração da hemoglobina não tenha sido suficiente para compensar a menor solubilidade do oxigênio em maiores temperaturas. Para entender melhor este processo, seria importante quantificar a expressão de subtipos de hemoglobina, com diferentes afinidades ao oxigênio, bem como os diferentes isotipos de LDH envolvidas no metabolismo do piruvato, especialmente no fígado, a fim de verificar se, neste caso, houve incremento anaeróbio – que seria representado por uma maior afinidade da LDH pelo piruvato, com a reação tendendo a produzir mais lactato – ou se houve incremento aeróbio – com a LDH catalisando preferencialmente a formação de piruvato. Além disso, subprodutos do metabolismo anaeróbio poderiam ser quantificados (VAN DIJK et al., 1999) a fim de mensurar a tendência do organismo a realizar metabolismo anaeróbio.

A atividade da citrato sintase, enzima do ciclo do ácido cítrico, não apresentou nenhum tipo de variação, nem entre temperaturas nem ao longo do tempo, indicando que não houve um incremento na atividade aeróbia de *N. coriiceps* nestas condições. Um resultado semelhante foi obtido para o peixe

criopelágico *Pagothenia borchgrevinki* quando submetidos às temperaturas de -1°C e 4°C por 4 a 5 semanas (SEEBACHER et al., 2005). Considerando o comportamento da LDH e da hemoglobina, é possível inferir que, em 30 dias, ainda existe uma regulação metabólica no sentido de um metabolismo anaeróbio, mediante disponibilização de glicose para os demais tecidos do corpo, tanto via glicogenólise – dada a evidente diminuição da concentração de glicogênio em 4°C após 30 dias – quanto via gliconeogênese – mediante disponibilização de substrato pela própria LDH hepática.

No tecido muscular, a LDH não apresentou diferença na sua concentração entre 0°C e 4°C em nenhum tempo de exposição, embora tenha havido bastante variação individual nos valores. Ao longo do tempo, não houve variação em 4°C, mas o controle apresentou certa variação ao longo do tempo, que pode estar associada a condições do bioensaio. Ademais, este comportamento pode ser indicativo da menor sensibilidade do tecido muscular ao estresse térmico, quando comparado ao tecido hepático (VAN DIJK et al., 1999); além de ter relação com o fato de que esta espécie é sedentária, apresentando menor atividade natatória (NORTH, 1991). Embora *N. coriiceps* exiba uma preferência em utilizar a creatina-fosfato no tecido muscular para produção de ATP no lugar da glicólise (DUNN; JOHNSTON, 1986), e sua atividade natatória seja menor que em *N. rossii* (EASTMAN et al., 2011), a atividade da LDH muscular é quase duas vezes maior que o observado para outra espécie antártica, *N. rossii*, num estudo semelhante (EUGÊNIO, 2012), especialmente diante do aumento da temperatura.

Em tecidos essencialmente aeróbicos, como o tecido hepático, o déficit de oxigênio pode atingir as mitocôndrias, levando à anaerobiose mitocondrial. Desta forma, o aumento observado na atividade da CS em 4 dias de exposição a 8°C, pode indicar não necessariamente um aumento na produção de ATP pela via aeróbica, mas uma transição à anaerobiose mitocondrial. Esta transição só poderia ser confirmada através da dosagem de subprodutos do metabolismo anaeróbio, como succinato ou mesmo lactato (VAN DIJK et al., 1999), que não foi realizada neste estudo. Porém, o limite crítico de temperatura em ectotérmicos tem sido relacionado ao acúmulo de subprodutos anaeróbicos, que seriam, em última instância, a causa da morte por aquecimento (VAN DIJK et al., 1999).

A malato desidrogenase hepática não apresentou alteração significativa em sua atividade em 0°C e 4°C ao longo do tempo, porém, foi observada uma ampla variação individual na atividade desta enzima especialmente em 1 dia de exposição. Apesar de não envolverem a atividade da MDH, estudos relatam que esta espécie apresenta grande variabilidade individual nas respostas metabólicas e fisiológicas frente a diferentes situações ambientais, inclusive estresse térmico (HEISE; ABELE, 2008). Em 8°C não há diferença na atividade da MDH em comparação com a situação experimental de 4°C, embora a atividade seja maior que 0°C em 4 dias em ambas as temperaturas testadas. O aumento na concentração da hemoglobina em 30 dias de exposição a 4°C poderia explicar a não variação na concentração desta enzima, já que, uma vez que o suprimento de oxigênio seria restabelecido, o metabolismo aeróbico poderia ser realizado sem prejuízo. No entanto, como esta enzima atua tanto no ciclo do ácido cítrico quanto na gliconeogênese, é difícil determinar se a constância na atividade enzimática é devida ao suprimento de oxigênio ou se sua atuação está direcionada à gliconeogênese, mantendo os níveis de glicose teciduais adequados para a produção de ATP pela via glicolítica, independentemente da presença de oxigênio. No tecido muscular, onde a MDH atua basicamente no ciclo do ácido cítrico, a atividade em 4°C não é significativamente diferente que em 0°C ao longo do tempo, com exceção de 1 dia, quando esta é maior tanto em 4°C quanto em 8°C.

A hiperglicemia é uma resposta comum ao estresse agudo em teleósteos em geral e pode estar associada à liberação de cortisol e adrenalina, hormônios relacionados ao estresse (MAZEAUD et al., 1977; LEACH; TAYLOR, 1980; VAN DIJK et al., 1993, 1999; LOWE; DAVISON, 2005). Submetido a um aumento gradual na temperatura, o peixe antártico *Pachycara brachicephalum* exibiu um aumento expressivo na glicemia próximo ao limite térmico crítico, entre 9°C e 10°C (VAN DIJK, 1999). Egginton et al. (1991) determinaram a glicemia de *N. coriiceps* em repouso ($1,67 \pm 0,93$ mM) e após estresse ($2,05 \pm 1,35$ mM). Neste trabalho, a glicemia dos animais é maior em 1 dia ($4,29 \pm 2,66$ mM) do que em 4 dias ($0,81 \pm 0,39$ mM) em 0°C, sendo que, em 15 dias há um novo aumento na glicemia seguido de uma diminuição em 30 dias. Estas variações na taxa glicêmica podem estar relacionadas com a aclimação às condições experimentais de laboratório, estado alimentar dos

animais e/ou variabilidade individual. Em 4°C, *N. coriiceps* exibiu aumento na glicemia somente em 30 dias de exposição. Em 8°C, porém, há um aumento expressivo em 1 dia, estando bem acima do valor encontrado em 0°C em 1 dia. Em 4 dias, a maior glicemia também foi observada em 8°C. Embora os hormônios relacionados ao estresse não tenham sido estudados, é provável que a hiperglicemia em 8°C tenha relação com a resposta ao estresse.

O aumento expressivo da glicemia em 8°C pode ser proporcionado pela mobilização de substratos energéticos, em especial glicogênio hepático. O nível de glicogênio hepático em 8°C é expressivamente menor do que em 0°C e 4°C, tanto em 1 dia quanto em 4 dias, coincidindo com a hiperglicemia observada na mesma temperatura. Embora a concentração média de glicogênio seja semelhante em 8°C entre 1 e 4 dias, fica difícil a discussão da mobilização de glicogênio hepático devido a existência de poucos dados (duas amostras) em 4 dias de exposição. Segundo Iwama et al. (2004) as reservas de glicogênio hepático, através da glicogenólise, disponibilizam uma maior quantidade de energia geralmente utilizada na tentativa do organismo se adaptar às condições desfavoráveis. Para Procarione et al. (1999) um aspecto central do estresse é a realocação da energia metabólica de investimento (utilizada no crescimento e reprodução), para atividades que possibilitem restaurar a homeostase, como a respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparo tecidual (WENDELAAR BONGA, 1997). Os dados obtidos envolvendo glicemia e glicogênio hepático indicam que a 4°C e principalmente a 8°C, em *N. coriiceps*, há uma maior mobilização de glicogênio hepático visando aumento da glicemia plasmática, conforme também observado por Van Dijk et al. (1999).

Neste trabalho, controversamente, a atividade da enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase) não é alterada ao longo do tempo em 8°C quando comparada a 0°C, havendo uma diminuição na atividade em 4°C após 4 dias de exposição. Vale lembrar que a G6Pase atua na gliconeôgenese tendo importante papel na exportação da glicose hepática, sendo crucial para o controle glicêmico (NORDLIE et al., 1999; VAN DE WERVE et al., 2000; SCHAFTINGEN; GERIN, 2002; NELSON; COX, 2008; NORDIE; FOSTER, 2010). Estudos feitos por Eugênio (2012), em *N. rossii*, espécie taxonomicamente muito próxima de *N. coriiceps*, testando as mesmas temperaturas e tempos de exposição deste trabalho, mostraram que o

potencial gliconeogênico, indicado pelos níveis de G6Pase, foi afetado de forma expressiva apenas em 8°C a partir de 4 dias de exposição. Tanto em *N. coriiceps* (este trabalho) quanto *N. rossii* (EUGENIO, 2012) não foram observadas diferenças significativas na atividade da G6Pase entre 0°C e 4°C num dado tempo de exposição. Talvez, em *N. coriiceps*, a regulação glicogênio/glicemia/G6Pase ocorra a longo prazo, sendo difícil esta análise em 8°C uma vez que esta espécie sobrevive somente 5 dias nesta temperatura. Para Sidell-Wilson et al. (1973), as concentrações desta enzima em *goldfish* apresentam oscilações quando os organismos são submetidos a novos regimes de temperatura, sendo que a estabilização pode levar até quatro semanas para ocorrer. Estudos apontam que em teleósteos tropicais tanto a atividade quanto a expressão do mRNA da G6Pase é altamente dependente do estado alimentar e do tipo de dieta (PANSERAT et al., 2000, 2001; CASERAS et al., 2002). Em *Spartus aurata*, a atividade da G6Pase apresenta alterações entre 10 a 15 horas após a alimentação, e a expressão do mRNA entre 4 e 15 horas (CASERAS et al., 2002). Já a temperatura não influencia na atividade da G6Pase nesta espécie, sendo importante na captação de glicose pelo tecido hepático através da enzima glicoquinase (PANSERAT et al., 2001).

A concentração de proteínas hepáticas não variou ao longo do tempo, nem entre as temperaturas, mesmo diante da variação na atividade de diversas enzimas demonstrada neste trabalho. Boa parte da composição proteica do tecido hepático é constituída por enzimas (BERNE et al., 2000). Uma vez que a atividade de uma enzima não está relacionada somente com a sua concentração mas também às suas propriedades cinéticas (SOMERO, 1973), este resultado não é inesperado. Já no tecido muscular, onde boa parte das proteínas tem função basicamente estrutural, pode existir o consumo das proteínas como substrato energético, em caso de déficit energético. Nesse sentido, *N. coriiceps* exibiu uma diminuição na concentração de proteínas musculares em 4°C ao final de 30 dias de exposição. Evidentemente, o estado alimentar tem grande influência na utilização de proteínas como substrato energético, mas a limitação na capacidade relacionada ao aumento de temperatura (PÖRTNER, 2001) pode estimular a utilização de diferentes substratos para produção de ATP. A utilização de proteínas como substrato energético é, geralmente, uma resposta de mais longo prazo, uma vez que há

uma preferência na utilização de ácidos graxos como fonte energética (CROCKETT; SIDELL, 1990; SIDELL et al., 1995; BRODTE et al., 2008).

Em peixes antárticos existe uma preferência na utilização de ácidos graxos monoinsaturados como combustível, ao menos nos tecidos onde esta via é possível (CROCKETT; SIDELL, 1990; SIDELL et al., 1995; BRODTE et al., 2008). Porém, o metabolismo de lipídeos tem consequências importantes no aumento do potencial oxidativo (CROCKETT, 2011). Sendo assim, metabolizar lipídeos pode ampliar o potencial dano oxidativo devido à tendência à produção de peróxido de hidrogênio, uma importante espécie reativa de oxigênio (ST-PIERRE et al., 2002). Além disso, o próprio estresse térmico tem sido apontado como causador de estresse oxidativo. Com o choque térmico há alteração no transporte de elétrons e pode haver modificação em moléculas do sistema antioxidante, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (COGO et al., 2009). A enzima glutathione-S-transferase, por exemplo, tem sua atividade alterada com o aumento da temperatura (BAGNYUKOVA et al., 2007). Animais ectotérmicos antárticos apresentam maiores níveis de enzimas do sistema de defesa antioxidante naturalmente, por estarem expostos a um ambiente que propicia maior produção de ROS, dada a alta disponibilidade de oxigênio (ABELE; PUNTARULLO, 2004; ANSALDO et al., 2000). Pörtner (2001) definiu dois limites de tolerância à mudança de temperatura: a temperatura *pejus*, a qual marca as limitações do escopo aeróbico e os primeiros sintomas de hipoxia no sangue, e a temperatura crítica, na qual começam a surgir os sintomas de anaerobiose mitocondrial. Utilizando os mesmos parâmetros, Abele e Puntarulo (2004) descreveram o impacto do aumento de temperatura sobre o sistema de defesa antioxidante em organismo polares, indicando um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, na temperatura *pejus*, e uma queda na atividade da SOD acompanhada de um acúmulo de produtos do estresse oxidativo na temperatura crítica. *N. coriiceps* exibiu um aumento na atividade da SOD no tecido muscular somente em 4 dias de exposição, à medida que a temperatura foi elevada. No entanto, nas três temperaturas testadas, a maior atividade foi observada em 1 dia de exposição. Isso pode indicar que a resposta na atividade desta enzima já é efetiva em 1 dia, sendo que 4 dias é tempo suficiente para o restabelecimento do equilíbrio redox dos tecidos. Para confirmar esta hipótese, no entanto, seriam

necessárias dosagens dos produtos do estresse oxidativo na célula, que não foram realizadas neste trabalho. No tecido hepático as variações na atividade da SOD não acompanharam a mesma tendência do tecido muscular, em especial em 4 dias, quando a atividade em 0°C é sensivelmente maior que em 4°C. De fato, a atividade da SOD não foi maior em 4°C ou 8°C em nenhuma situação, exceto em 1 dia de exposição a 8°C, indicando novamente uma possível resposta rápida da enzima, que pode compensar os efeitos do estresse oxidativo relacionado ao aquecimento ao longo do tempo.

Peixes antárticos apresentam osmolaridade plasmática maior do que teleósteos de águas menos gélidas (DOBBS III; DEVRIES, 1974; O'GRADY et al., 1982). Franklin et al. (1991) demonstraram que *Pagothenia borchgrevinki* exibe aumento na osmolaridade plasmática e na concentração de íons cloreto. Em ambiente marinho, o potencial elétrico transbranquial é importante e positivo, favorecendo a secreção passiva de cátions, como o sódio (POTTS, 1984; KIRSCHNER, 1997), de modo que o cloreto é o principal íon transportado ativamente. Portanto, a concentração de íons cloreto está intimamente ligada à regulação da osmolalidade plasmática em teleósteos. Neste estudo, *N. coriiceps* exibiu uma redução importante da concentração plasmática de cloreto, de modo semelhante à exibida por *N. rossi*, conforme Eugênio (2012). Esta alteração demonstra a capacidade de regulação hiposmótica mediante estresse térmico (EUGÊNIO, 2012). Infelizmente, as análises da concentração de íons cloreto na temperatura de 8°C não foi conduzida, a fim de se compreender o papel deste eletrólito na manutenção da osmolalidade plasmática na temperatura mais estressante ao animal.

Em suma, este trabalho aponta que *Notothenia coriiceps* tem uma capacidade de ajuste limitada diante de um aumento agudo de temperatura (8°C), evidenciada principalmente pela morte prematura dos espécimes submetidos a esta condição. A temperatura de 4°C causa menos estresse nesta espécie quando comparada a 8°C, porém o animal demanda maior tempo para ajuste das suas necessidades metabólicas. Comparada a *N. rossi*, proveniente da mesma região, *N. coriiceps* exibe maior sensibilidade ao aumento de temperatura, sendo que a outra espécie é capaz de sobreviver por até 90 dias em 8°C. Estudos em andamento no Laboratório de Biologia Adaptativa – UFPR focados na investigação de respostas de curto (até 6 dias)

e longo prazo (90 dias ou mais) ao estresse por aquecimento são importantes complementos a estes resultados, pois auxiliarão na compreensão dos limites metabólicos destes animais e da sua vulnerabilidade diante das mudanças climáticas globais.

6 CONCLUSÕES

- 1- O choque térmico em 8°C é mais estressante do que 4°C para *Notothenia coriiceps*, levando à morte dos animais em 5 dias.
- 2- Há respostas metabólicas rápidas em 8°C, como o aumento na concentração de hemoglobina (4 dias), hiperglicemia (1 dia) e quebra de glicogênio hepático (1 e 4 dias). Há ainda um aumento na atividade da SOD muscular e da CS acompanhando o aumento de temperatura em 4 dias. Porém, estas respostas parecem não compensar os efeitos letais do choque térmico a 8°C em *N. coriiceps*.
- 3- O ajuste das necessidades metabólicas em 4°C é lento em *N. coriiceps*, demandando um tempo de 30 dias para o restabelecimento do suprimento de oxigênio – evidenciado pelo aumento na concentração de hemoglobina, na atividade da LDH hepática e na diminuição da concentração de proteínas musculares.
- 4- O sistema de defesa antioxidante em *N. coriiceps* parece apresentar uma resposta rápida frente ao choque térmico, mas análises mais detalhadas podem elucidar melhor a atuação deste sistema diante do estresse térmico.

REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004.
- ALEGRE, M.; CIUDAD, C. J.; FILLAT, C.; GUINOVART, J. J. Determination of glucose-6-phosphatase activity using the glucose dehydrogenase-coupled reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 173, n. 1, p.185-189, 1988.
- ANSALDO, M.; LUQUET, C. M.; EVELSON, P.A.; POLO, J. A. M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v. 23, p. 160 – 165, 2000.
- ARIGONY-NETO, J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v. 4, p. 187-190. 2004.
- BAGNYUKOVA, T. V.; LUZHNA, L. I.; POGRIBNY, I. P.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 8, 658–665, 2007.
- BARBOSA, D. A.; VANI, G. S.; BACILA, M.; RODRIGUES, E. **Comparative aspects of urea metabolism and cold adaptation in Antarctic fish**. In: IX SCAR INTERNATIONAL BIOLOGY SYMPOSIUM, 2005, Curitiba. Anais... p. 104.
- BARNES, D. K. A.; PECK, L. S. Vulnerability of Antarctic shelf biodiversity to predicted regional warming. **Climate Research**, v. 37, n.2-3, p. 149-163, 2008.
- BELLISIO, N. B. **Peces Antárticos del Sector Argentino. Parte I: Taxinomía y Biología de *Chaenocephalus aceratus* y *Notothenia neglecta* de Orcadas del Sur**. Buenos Aires, Secretaria de Marina, Servicio de Hidrografia Naval. Publicacion H. 900, 90. pp. 1964.
- _____; TOMO, A. **Biogeografia de la Peninsula Antartica, Archipelagos y Mares Adyacentes**. Buenos Aires, 1974.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.
- BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53-60, 1997.

BILYK, K.T.; DEVRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.158, n.4, p.382-390, 2011.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAUN, M.; SIMÕES, J. C.; VOGT, S.; BREMER, U. F.; BLINDOW, N.; PFENDER, M.; SAURER, H.; AQUINO, F. E.; FERRON, F. A. An improved topographic database for King George Island: compilation, application and outlook. **Antarctic Science**. v. 13, n. 1, p. 41-52, 2001.

BRETT, J. R. Fish - The energy cost of living. In: MCNEIL, W. J. (Ed.) **Marine Aquaculture**. Corvallis: Oregon State University Press, 1970. p. 37-52.

BRODTE, E.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). **Polar Biology**. v.30, n.1, p. 95-107, 2006.

_____; GRAEVE, M.; JACOB, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O. Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). **Fish Physiology and Biochemistry**. v.34, n.3, p. 261-274, 2008.

CARPENTER, C. M.; HOFMANN, G. E. Expression of 70 kDa heat shock proteins in antarctic and New Zealand notothenioid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology** v.125, n.2, p. 229-238, 2000.

CASERAS, A.; METON, I.; VIVES, C.; EGEA, M.; FERNANDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 607-614, 2002.

CHILDRESS, J. J; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n.3, p. 273-283, 1979.

CLARKE, A.; JOHNSTON, I. A. Evolution and adaptive radiation of antarctic fishes. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 5, p. 212-218, 1996.

_____; MURPHY, E. J.; MEREDITH, M. P.; KING, J. C.; PECK, L. S.; BARNES, D. K. A.; SMITH, R. C. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n.1477, p. 149-166, 2007.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v.7, n.1, p. 37-42, 2009.

CROCKETT, E. L. Antioxidant potential is positively correlated with mitochondrial enzyme activity in Antarctic and non-Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 34, n. 1, p. 113-118, 2011.

_____.; SIDELL, B. D. Some pathways of energy-metabolism are cold adapted in antarctic fishes. **Physiological Zoology**, v. 63, n. 3, p. 472-488, 1990.

CROUCH, R. K.; GANDY, S.E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH, G. M. P.; BUSE, M. G. The inhibition of islet superoxide-dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235-241, 1981.

DI PRISCO, G. Lifestyle and biochemical adaptation in Antarctic fishes. **Journal of Marine Systems**, v. 27, n. 1-3, p. 253-265, 2000.

_____.; EASTMAN, J. T.; GIORDANO, D.; PARISI, E.; VERDE, C. Biogeography and adaptation of Notothenioid fish: Hemoglobin function and globin-gene evolution. **Gene**, v. 398, n. 1-2, p.143-155, 2007.

DOBBS III, G. H.; DEVRIES, A. L. Renal function in Antarctic teleost fishes: Serum and urine composition. **Marine Biology**, v. 29, n. 1, p. 59-70. 1974.

DONATTI, L. **Comportamento alimentar de peixes antárticos mantidos experimentalmente em condições laboratoriais**. In: XVIII ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, 2000, Florianópolis, Anais. 2000, p. 17-20.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356. 1956.

DUNN, J. F.; JOHNSTON, I. A. Metabolic constraints on burst swimming in the Antarctic teleost *Notothenia neglecta*. **Marine Biology**, v. 91, n. 4, p. 433-440, 1986.

EASTMAN, J.T. **Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, 1993.

_____. The nature of the diversity of Antarctic fishes. **Polar Biology**, v. 28, p. 93-107, 2005.

_____.; LANNOO, M. J. Brain and sense organ anatomy and histology in hemoglobinless Antarctic icefishes (Perciformes: Notothenioidei: Channichthyidae). **Journal of Morphology**, v. 260, n. 1, p. 117-140, 2004.

_____.; BARRERA-ORO, E.; MOREIRA, E. Adaptive radiation at a low taxonomic level: divergence in buoyancy of the ecologically similar Antarctic fish

Notothenia coriiceps and *N. rossii*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 438, p. 195-206, 2011.

EGGINTON, S.; TAYLOR, E. W.; WILSON, R. W.; JOHNSTON, I. A.; MOON, T. W. Stress response in the Antarctic teleosts (*Notothenia neglecta* Nybelin and *N. rossii* Richardson). **Journal of Fish Biology**, v. 38, n. 2, p. 225-235, 1991.

ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R.; FONG, J. D.; POLACK, D. A. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). **Zootaxa**, v. 2525, n. 1, p. 19-50, 2010.

EUGÊNIO, D. S. **Plasticidade metabólica e fisiológica do peixe antártico *Notothenia rossii* (Richardson 1844) aclimatado a altas temperaturas**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

Disponível em:

<<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/32159/R%20-%20D%20-%20DANILO%20SANTOS%20EUGENIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

FANTA, E. Laboratory tests on feeding interactions on some Antarctic fish from Admiralty Bay (King George Island, South Shetlands). **Polish Polar Research**, v. 20, n. 4, p. 335-346, 1999.

_____.; LUCCHIARI, P. H.; BACILA, M. The effect of temperature increase on the behaviour of Antarctic fish. **Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology**, v. 2, p. 123-130, 1989.

_____.; MEYER, A. A.; GRÖTZNER, S. R.; LUVIZOTTO, M. F. Comparative study on feeding strategy and activity patterns of two Antarctic fish *Trematomus newnesi* Boulenger 1902 and *Gobionotothen gibberifrons* (Lönnerberg, 1905) (Pisces, Nototheniidae) under different light conditions. **Antarctic Record**, v. 38, n. 1, p. 13-29, 1994.

_____.; LUVIZOTTO, M. F.; MEYER, A. A. Gill structure of the Antarctic fishes *Notothenia (Gobionotothen) gibberifrons* and *Trematomus newnesi* (Nototheniidae) stressed by salinity changes and some behavioural consequences. **Antarctic Record**, v. 39, n. 1, p. 25-39, 1995.

_____.; MEYER, A. A. Behavioural strategies for feeding of six species of the Antarctic fish family Nototheniidae (Pisces, Notothenioidei) in a tank. **Antarctic Record**, v. 42, n. 3, p. 227-243, 1998.

_____.; KIDAWA, A. The effect of amino acids and amphipods extract on the respiratory metabolism of the Antarctic spiny plunderfish *Harpagifer antarcticus* (Nybelin 1947). **Polskie Archiwum Hydrobiologii**, v. 46, p. 297-302, 1999.

_____.; DONATTI, L.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; ZALESKI, T. Food detection and the morphology of some sensory organs in the Antarctic blackfin icefish *Chaenocephalus aceratus* Lönnerberg, 1906. In: HUISKES, A. H. L.;

ROZEMA, J.; SCHORNO, R. M. L.; VAN DE VIES, S. M.; WOLFF, W. J. (Ed.) **Antarctic Biology in a global context**, Leiden: Backhuys, 2003. p. 126-131.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDER, H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FIELDS, P. A.; SOMERO, G. N. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A₄ orthologs of Antarctic notothenioid fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 19, p. 11476-11481, 1998.

FITCH, N. A. Lactate dehydrogenases in Antarctic and temperate fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 91, n. 4, p. 671-676, 1988.

_____; JOHNSON, I. A.; WOOD, R. E. Skeletal muscle capillary supply in a fish that lacks respiratory pigments. **Respiration Physiology**, v. 57, n. 2, p. 201-211, 1984.

FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W.; CAREY, P. W. The stress response of an antarctic teleost to an acute increase in temperature. **Journal of Thermal Biology**, v. 16, n. 3, p. 173-177. 1991.

GIESEG, S. P.; CUDDIHY, S.; HILL, J. V.; DAVISON, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 3, p. 371-378, 2000.

GUILLAUME, J.; KAUSHIK, S.; BERGOT, P.; METAILLER, R. **Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans**. Heidelberg: Springer Verlag, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 8, n. 2, p. 89-193, 1985.

HEISE, K.; ABELE, D. Response of blood parameters of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) to warming and hypoxia. In: WIENCKE, C.; FERREYRA, G.; ABELE, D.; MARENSSI, S. (Ed.) **The Potter Cove coastal ecosystem, Antarctica**. Synopsis of research performed 1999-2006 at the Dallmann Laboratory and Jubany Station, King George Island (Isla 25 de Mayo). Berichte zur Polarforsch. 2008.

HOCHACHKA, P. W.; LEWIS, J. K. Interacting effects of pH and temperature on the Km values for fish tissue lactate dehydrogenases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 925-933, 1971.

_____.; SOMERO, G. N. The adaptation of enzymes to temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 27, n. 3, p. 659-664, 1968.

_____.; _____. **Biochemical Adaptation**: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press, 2002.

HOFMANN, G. E.; BUCKLEY, B. A.; AIRAKSINEN, S.; KEEN, J. E.; SOMERO, G. N. Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* (Family nototheniidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 15, p. 2331-2339, 2000.

HOLLAND, L. Z.; MCFALL-NGAI, M.; SOMERO, G. N. Evolution of lactate dehydrogenase-A homologs of Barracuda fishes (Genus *Sphyraena*) from different thermal environments: differences in kinetic properties and thermal stability are due to amino acid substitutions outside the active site. **Biochemistry**, v. 36, n. 11, p. 3207-3215, 1997.

HUDSON, H. A.; BRAURER, P. R.; SCOWELD, M. A.; PETZEL, D. H. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 31, n. 8, p. 991-997, 2008.

IWAMA, G.; AFONSO, L.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 1, p. 15-19, 2004.

JIN, Y.; DEVRIES, A. L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 3, p. 290-300, 2006.

JOHNS, G. C.; SOMERO, G. N. Evolutionary convergence in adaptation of proteins to temperature: A₄-lactate dehydrogenases of Pacific damselfishes (*Chromis* spp.). **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 314-320, 2004.

KAMLER, E.; KRASICKA, B.; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Comparison of lipid content and fatty acid composition in muscle and liver of two notothenioid fishes from Admiralty Bay (Antarctica): an eco-physiological perspective. **Polar Biology**, v. 24, n. 10, p. 735-743, 2001.

KAWALL, H. G. **Metabolic responses of Antarctic organisms: responses to the ice-edge bloom and cold adaptation**. 1998. 101 f. Thesis (Doctorate degree in "Marine Science") Department of Marine Science, College of Arts and Science, University of South Florida, Tampa, 1998.

_____.; SOMERO, G. N. Temperature compensation of enzymatic activities in brain of Antarctic fishes: evidence for metabolic cold adaptation. **Antarctic Journal of the United States**, v. 31, p. 115-117, 1996.

KNOX, G. A. **The biology of the Southern Ocean**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

KOCK, K. H. **Antarctic Fish and Fisheries**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

KULENZ, J. Seasonal biology of *Notothenia gibberifrons*, *N. rossi* and *Trematomus newnesi*, as well as respiration of young fish from Admiralty Bay (King George, South Shetland Islands). **Polskie Archiwum Hydrobiologii**, v. 1, n. 41, p. 79-102. 1994.

LANNIG, G.; STORCH, D.; PÖRTNER, H. O. Aerobic mitochondrial capacities in Antarctic and temperate eelpout (Zoarcidae) subjected to warm versus cold acclimation. **Polar Biology**, v. 28, n. 8, p. 575-584, 2005.

LEACH, G. J.; TAYLOR, M. H. The role of cortisol in stress-induced metabolic changes in *Fundulus heteroclitus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 42, n. 2, p. 219-27, 1980.

LEVINS, R. **Evolution in Changing Environments**: some Theoretical Explorations. Princeton: Princeton University Press, 1968.

LONDRAVILLE, R. L.; SIDELL, B. D. Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes. **Journal of Experimental Biology**, v. 150, n.1, p. 205-220, 1990.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 3, p. 752-766, 2005.

_____; SEEBACHER, F.; _____. Thermal sensitivity of heart rate and insensitivity of blood pressure in the Antarctic nototheniid fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 175, n. 2, p. 97-105, 2005.

MARK, F. C.; BOCK, C.; PÖRTNER, H. O. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and ³¹P-MRS. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 5, p. R1254-R1262, 2002.

MASSOM, R. A.; STAMMERJOHN, S. E. Antarctic sea ice change and variability - Physical and ecological implications. **Polar Science**, v. 4, n. 2, p. 149-186, 2010.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish - some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.106, n. 3, p. 201-212, 1977.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: Princípios de Bioquímica. New York: Freeman and Company, 2008.

NORDLIE, R. C.; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 379-406, 1999.

_____.; _____. A retrospective review of the roles of multifunctional glucose-6-phosphatase in blood glucose homeostasis: Genesis of the tuning/returning hypothesis. **Life Sciences**, v. 87, n. 11-12, p. 339-349, 2010.

NORTH, A. W. Review of the early life history of Antarctic notothenioid fish. In: DI PRISCO G., MARESCA B., TOTA B. (Ed.). **Biology of Antarctic fishes**. Springer-Verlag, New York, 1991. p.70-86.

O'BRIEN, K. M.; SIDELL, B. D. The interplay among cardiac ultrastructure, metabolism and the expression of oxygen-binding proteins in Antarctic fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, n. 8, p. 1287-1297, 2000.

O'GRADY, S. M.; ELLORY, J. C.; DEVRIES, A. L. Protein and glycoprotein antifreezes in the intestinal fluid of polar fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 98, p. 429-438. 1982.

PANSERAT, S.; MÉDALE, F.; BRÉQUE, J.; PLAGNES-JUAN, E.; KAUSHIK, S. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 22-29, 2000.

_____.; CAPILLA, E.; GUTIERREZ, J.; FRAPPART, P. O.; VACHOT, C.; PLAGNES-JUAN, E.; AGUIRRE, P.; BRÉQUE, J.; KAUSHIK, S. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly represented in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 2, p. 275-283, 2001.

PARK, H.; AHN, I. Y.; PARK, K. I.; HYUN, S. (2008a) Response of antioxidant defence system to thermal stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. **Antarctic Science**, v. 20, n. 6, p. 521-526, 2008.

_____.; _____. Y.; KIM, H.; CHEON, J.; KIM, M. (2008b) Analysis of ESTs and expression of two peroxiredoxins in the thermally stressed Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 5, p. 550-559, 2008.

PECK, L. S.; CONVEY, P.; BARNES, D. K. A. Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predictability. **Biological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 75-109, 2006.

PETRICORENA, Z. L. C.; SOMERO, G. N. Biochemical adaptations of notothenioid fishes: Comparisons between cold temperate South American and New Zealand species and Antarctic species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & integrative physiology**, v. 147, n.3, p. 799-807, 2007.

PODRABSKI, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v. 30, n. 1, p. 39-43, 2006.

PÖRTNER, H. O. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 4, p. 137-146, 2001.

_____. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & integrative physiology**, v. 132, n. 4, p. 739-761, 2002.

PROCARIONE, L. S.; BARRY, T. P.; MALISON, J. A. Effects of high rearing density and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 61, n. 2, p. 91-96, 1999.

RAGA, G. **Dieta e metabolismo de *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) na Baía do Almirantado – Ilha Rei George – Península Antártica**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2012.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. The hydrography of Admiralty Bay and its inlets, coves and lagoons (King George Island, Antarctica). **Polish Polar Research**, v. 16, n. 1-2, p. 61-70, 1995.

RIOS, F. S.; FANTA, E. Morphology of the gill rakers and their ecological function in the feeding of the Antarctic fish *Notothenia neglecta* Nybelin. **Antarctic Record**, v. 42, n. 2, p. 131-150, 1998.

ROBINSON, E.; DAVISON, W. The Antarctic notothenioid fish *Pagothenia borchgrevinkii* is thermally flexible: acclimation changes oxygen consumption. **Polar Biology**, v. 31, n. 3, p. 317-326, 2007.

RODRIGUES, E.; ROSA, R.; BACILA, M. The effect of temperature on the kinetic properties of lactate dehydrogenase from the epaxial muscle of the Antarctic fish *Notothenia gibberifrons* Lonnberg. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1231-1236, 1995.

ROGERS, A. D. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1488, p. 2191-2214, 2007.

ROMÃO, S.; FREIRE, C. A.; FANTA, E. (2001) Ionic regulation and Na, K-ATPase activity in gills and kidney of the aglomerular Antarctic fish *Notothenia neglecta* upon exposure to seawater dilution. **Journal of Fish Biology**, v. 59, n. 2, p. 463-468, 2001.

SABOROWSKI, R.; BUCCHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 557-565, 2002.

SCHAEFER, C. E. G. R.; FRANCELINO, M. R.; SIMAS, F. N. B.; ALBUQUERQUE, M. R. **Ecossistemas Costeiros e Monitoramento Ambiental da Antártica Marítima** – Baía do Almirantado, Ilha Rei George. Viçosa, NEPUT, p. 107-117, 2004

SCHAFTINGEN, E. V.; GERIN, I. Review Article: The glucose-6-phosphatase system. **Biochemical Journal**, v. 362, n. 3, p. 513-532, 2002.

SEEBACHER, F.; DAVISON, W.; LOWE, C. J.; FRANKLIN, C. E. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. **Biology Letters**, v. 1, n. 2, p. 151-154, 2005.

SIDELL, B. D. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1119-1128, 1998.

_____; O'BRIEN, K. M. When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 10, p. 1791-1802, 2006.

_____; WILSON, F. R.; HAZEL, J.; PROSSER, C. L. Time course of thermal acclimation in goldfish. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 84, n. 2, p. 119-127, 1973.

_____; CROCKETT, E. L.; DRIEDZIC, W. R. Antarctic fish-tissues preferentially catabolize monoenoic fatty-acids. **J Exp Zool**, v. 271, n. 2, p. 73-81, 1995.

SIEGERT, M. J.; FLORINDO, F. Antarctic Climate Evolution. In: FLORINDO, F.; SIEGERT, M. (Ed.). **Developments in Earth and Environmental Sciences 8** Antarctic Climate Evolution. Amsterdam: Elsevier, 2009. p.1-11.

SOMERO, G. N. Thermal modulation of pyruvate metabolism in the fish *Gillichthys mirabilis*: the role of lactate dehydrogenases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 205-206, 1973.

_____; DEVRIES, A. L. Temperature tolerance of some Antarctic fishes. **Science**, v. 156, n. 3772, p. 257-258, 1967.

_____; FIELDS, P. A.; HOFMANN, G. E.; WEINSTEIN, R.B.; KAWALL, H. Cold adaptation and stenothermy in Antarctic Notothenioids fishes: what has been gained and what has been lost? In: DIPRISCO, G.; PISANO, E.; CLARKE, A. (Ed.) **Fishes of Antarctica - A Biological Overview**. Milano: Springer-Verlag, 1998.

_____. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v.139, n. 3, p. 321-333, 2004.

ST-PIERRE, J.; BUCKINGHAM, J. A.; ROEBUCK, S. J.; BRAND, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44784-44790, 2002.

THORNE, M. A. S.; BURNS, G.; FRASER, K. P. P.; HILLYARD, G.; CLARK, M. S. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. **Marine Genomics**, v. 3, n. 1, p. 35-44, 2010.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 3, p. 603-611, 2005.

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N. Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. **Marine Biology**, v. 98, n. 2, p. 169-180, 1988.

TRIPATI, A.; BACKMAN, J.; ELDERFIELD, H.; FERRETTI, P. Eocene bipolar glaciation associated with global carbon cycle changes. **Nature**, v. 436, n. 7049, p. 341-346, 2005.

VAN DE WERVE, G.; LANGE, A.; NEWGARD, C.; MECHIN, M. C.; LI, Y. Z.; BERTELOOT, A. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 6, p. 1533-1549, 2000.

VAN DIJK P. L. M.; VAN DER THILLART, G. E. E. J. M.; WENDELAAR-BONGA, S. E. Is there a synergistic effect between steady state exercise and water acidification in carp? **Journal of Fish Biology**, v. 42, n. 5, p. 673-681, 1993.

VAN DIJK, P. L. M.; TESCH, C.; HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O. Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 202, n. 24, p. 3611-3621, 1999.

VAUGHAN, D. G.; MARSHALL, G. J.; CONNOLEY, W. M.; PARKINSON, C.; MULVANEY, R.; HODGSON, D. A.; KING, J. C.; PUDSEY, C. J.; TURNER, J. Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. **Climatic change**, v. 60, n. 3, p. 243-274, 2003.

WEINSTEIN, R. B.; SOMERO, G. N. Effects of temperature on mitochondrial function in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 168, n. 3, p. 190-196, 1998.

WENDELAAR-BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WOHLSHLAG, D. E. Metabolism of an Antarctic fish and the phenomenon of cold adaptation. **Ecology**, v. 41, n. 2, p. 287-292. 1960.

ANEXOS

ANEXO 1 – Protocolo para determinação da concentração de glicogênio nos tecidos muscular e hepático. (DUBOIS et al, 1956, modificado por BIDINOTO et al, 1997).

Reagentes:

- KOH 6M
- Etanol 95%
- K₂SO₄ (10%)
- Água destilada
- Fenol 4,1%
- Solução padrão de glicose 100 mM

Procedimento:

Dissolver 100 mg de tecido em 1 mL de KOH em banho-maria fervente por 3 a 5 minutos (até a completa dissolução do tecido)

Transferir 250 µL desta suspensão para um tubo Falcon e adicionar 3 mL de Etanol. Agitar para homogeneizar a mistura.

Adicionar 100 µL de K₂SO₄ e agitar.

Centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos e descartar o sobrenadante invertendo o tubo.

Adicionar 2,5 mL de água destilada ao precipitado, agitando para dissolução completa.

Segue abaixo a marcha analítica:

TUBO	EXTRATO (µL)	H2O MILI- Q (µL)	PADRÃO (µL)	FENOL 4,1% (ml)	H2SO4 concentrad o (ml)
Amostra	50 (fígado)	450	---	0,5	2
	500 (músculo)	250			
Padrão	---	400	100	0,5	2
Branco	---	500	---	0,5	2

A leitura é realizada imediatamente em 480 nm.

ANEXO 2 – Resultados da ANOVA resumidos, contendo o valor de F e o valor de p correspondente para as análises realizadas neste trabalho.

TABELA 3 – TABELA DE ANOVA RESUMIDA CONTENDO O VALOR DE F E O RESPECTIVO VALOR DE P PARA AS ANÁLISES DE EXPOSIÇÃO A 0°C E 4°C POR 1, 4, 15 E 30 DIAS.

Fonte de variação	Glicose			Colesterol			Triglicerídeos			Proteínas Totais			Albumina			Hemoglobina			Cálcio		
	F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p	
T Exp	1,3962	0,2418	ns	21,2533	0,000001	****	18,588	0,00001	****	0,92170	0,434896	ns	3,8725	0,01260	*	9,10760	0,00004	****	10,2537	0,00001	****
T°C	15,2031	0,0002	***	30,4778	0,000521	***	0,000	0,98391	ns	8,06330	0,005888	**	0,3423	0,56036	ns	4,80890	0,03164	*	4,4294	0,03887	*
T Exp x T°C	55,0922	< 2,2e-16	****	4	0,007306	**	3,044	0,03433	*	0,92540	0,433082	ns	19,7240	0,00000	****	8,29470	0,00009	****	15,5865	0,00000	****

Fonte de variação	Cloro			Magnésio			Proteína hepática			Proteína muscular			Glicogênio hepático			Glicogênio muscular			G6Pase		
	F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p	
T Exp	23,8567	0,00000	****	125,553	0,00000	****	1,9446	0,13079	ns	4,8156	0,004489	**	0,4140	0,66360	ns	7,0673	0,000361	***	5,89080	0,001360	**
T°C	3,6095	0,06176	ns	18,381	0,00006	****	1,4878	0,22684	ns	3,9082	0,052577	ns	1,8417	0,18170	ns	0,3658	0,547457	ns	3,06120	0,085295	ns
T Exp x T°C	29,4578	0,00000	****	13,894	0,00000	****	2,3484	0,08037	ns	25,4686	0,000000	****	56,7247	0,00000	****	8,7788	0,000060	****	4,47660	0,006673	**

Fonte de variação	CS			LDH hepática			MDH hepática			SOD hepática			LDH muscular			MDH muscular			SOD muscular		
	F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p	
T Exp	1,1883	0,32158	ns	3,2965	0,02628	*	2,9792	0,0390463	*	33,8408	0,000000	****	4,3197	0,007993	**	5,5031	0,002065	**	31,5577	0,000000	****
T°C	5,7095	0,01993	*	38,5728	0,00000	****	15,8238	0,0002017	***	7,8755	0,006659	**	2,7676	0,101403	ns	6,7137	0,011953	*	7,8848	0,006686	**
T Exp x T°C	1,4117	0,24784	ns	2,0854	0,11142	ns	2,3524	0,0819177	ns	10,5429	0,000010	****	1,8901	0,140898	ns	2,1330	0,105256	ns	11,5349	0,000004	****

FONTE: a autora (2012).

LEGENDA: T Exp = Tempo de exposição; T°C = temperatura; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001; ns = não significativo.

TABELA 4 – TABELA DE ANOVA RESUMIDA CONTENDO O VALOR DE F E O RESPECTIVO VALOR DE P PARA AS ANÁLISES DE EXPOSIÇÃO A 0°C, 4°C E 8°C POR 1 E 4 DIAS. T

Fonte de variação	Glicose			Colesterol			Triglicerídeos			Proteínas Totais			Albumina			Hemoglobina			Cálcio		
	F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p	
T Exp	54,44	0,0000	****	13,5777	0,000539	***	28,829	0,00000	****	9,87450	0,0027	**	11,8631	0,001115	**	19,59000	0,00005	****	17,1940	0,00012	***
T°C	123,471	0,0000	****	13,3002	0,000021	****	36,575	0,00000	****	1,36920	0,2630	ns	19,3225	0,00000	****	23,77200	0,00000	****	74,2840	0,00000	****
T Exp x T°C	15,928	0,0000	****	1	0,3629623	ns	47,808	0,00000	****	6,29260	0,0035	**	0,9677	0,386464	ns	18,38800	0,00000	****	22,8690	0,00000	****

Fonte de variação	Cloro			Magnésio			Proteína hepática			Proteína muscular			Glicogênio hepático			Glicogênio muscular			G6Pase		
	F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p	
T Exp	-	-	-	22,702	0,00002	****	1,8552	0,17916	ns	5,1701	0,02769	*	4,3404	0,04400	*	3,0401	0,08777	ns	6,01890	0,017918	*
T°C	-	-	-	22,531	0,00000	****	4,5258	0,01551	*	5,0470	0,01043	*	50,0851	0,00000	****	6,8130	0,00252	**	0,10140	0,903742	ns
T Exp x T°C	-	-	-	1,173	0,31720	ns	0,6085	0,54809	ns	8,4455	0,000751	***	5,1917	0,01015	*	3,6310	0,034171	*	5,49020	0,007198	**

Fonte de variação	CS			LDH hepática			MDH hepática			SOD hepática			LDH muscular			MDH muscular			SOD muscular		
	F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p		F	p	
T Exp	4,7535	0,0341734	*	0,0156	0,90100	ns	3,9579	0,052890	ns	15,683	0,000247	***	4,4114	0,04147	*	9,2619	0,00386	**	59,7926	0,000000	****
T°C	8,0392	0,0009743	***	8,6319	0,00063	***	13,9741	0,000020	****	13,606	0,000021	****	0,9126	0,40894	ns	15,3029	0,00001	****	4,1655	0,022040	*
T Exp x T°C	2,2200	0,1196407	ns	0,2225	0,80133	ns	1,3816	0,261870	ns	12,810	0,000035	****	5,4702	0,00756	**	2,2713	0,11464	ns	6,5932	0,003130	**

FONTE: a autora (2012).

LEGENDA: Exp = Tempo de exposição; T°C = temperatura; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$; ns = não significativo. Não analisada a concentração de cloro nestas condições por falta de dosagem deste eletrólito em 8°C.